

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-509470

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月19日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 45/00	A E D	8415-4C	
38/00	A D U		
		9455-4C	A 6 1 K 37/ 22      A D U

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21)出願番号 特願平6-504755  
 (86)(22)出願日 平成5年(1993)7月26日  
 (85)翻訳文提出日 平成7年(1995)1月24日  
 (86)国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 7 0 2 3  
 (87)国際公開番号 W O 9 4 / 0 2 1 0 8  
 (87)国際公開日 平成6年(1994)2月3日  
 (31)優先権主張番号 9 1 7 , 7 1 5  
 (32)優先日 1992年7月24日  
 (33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 ザ・ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシ  
 ティ  
 アメリカ合衆国メリーランド州21205, バ  
 ルティモア, ラットランド・アベニュー  
 720  
 (72)発明者 クハイダ, フランシス・ビー  
 アメリカ合衆国メリーランド州21212, バ  
 ルティモア, セント・アルバンズ・ウェイ  
 5409  
 (72)発明者 バスターナック, ゲイリー・アール  
 アメリカ合衆国メリーランド州21210, バ  
 ルティモア, エッジヴェール・ロード311  
 (74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんの治療に脂肪酸合成阻害剤を用いる方法

## (57)【要約】

予後の悪い癌において脂肪酸シンターゼ(合成酵素)  
 (F A S) が、過剰発現されるが、正常組織においては、  
 F A S 発現が少ししか確認されない。脂肪酸合成の阻害  
 は癌細胞に選択的に毒性であるが、低F A S 活性の正常  
 細胞は耐性である。本発明は、癌患者の腫瘍の細胞によ  
 る脂肪酸合成を阻害し結果として疾病過程を停止する当  
 該癌患者を治療する方法を提供する。

参考(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 内因的に合成される脂肪酸に依存性の動物細胞増殖の増進を阻害する方法であって、脂肪酸合成の阻害剤を細胞増殖の増進を阻害するに足る量で当該細胞増殖に投与することを含む前記方法。
2. 1分当たり且つ1μgタンパク質当たり少なくとも10fモルのアセチルCoAがアシルグリセリドに取り込まれるような脂肪酸合成活性を示す動物細胞増殖の増進を阻害する方法であって、脂肪酸合成の阻害剤を細胞増殖の増進を阻害するに足る量で細胞増殖に投与することを含む前記方法。
3. 脂肪酸シリンターゼ活性を示すタンパク質を発現する動物細胞増殖の増進を阻害する方法であって、脂肪酸合成の阻害剤を細胞増殖の増進を阻害するに足る量で細胞増殖に投与することを含む前記方法。
4. 脂肪酸シリンターゼ活性を示すタンパク質を発現する細胞増殖を有する動物細胞増殖の増進を改善する方法であって、治療有効量の脂肪酸シリンターゼ阻害剤を当該患者に投与することを含む前記方法。
5. 内因的に合成される脂肪酸に依存性である細胞増殖を含む組織をもつ患者の組織の健康を改善する方法であって、脂肪酸合成の阻害剤を当該患者に投与することを含み、この阻害剤の量は前記細胞増殖の合成を阻害するに足るものである、前記方法。
6. 内因的に合成される脂肪酸に依存性である動物の生殖細胞を致す方法であって、前記細胞増殖による脂肪酸の合成を阻害するに足る量の脂肪酸合成阻害剤を当該患者に投与することを含み、この阻害剤の量は前記動物を致さないような量である、前記方法。
7. 前記患者が乳癌、膵臓癌、肺癌、大腸癌、及ぼ前立腺癌からなる群から選択される癌を有する請求の範囲1～5項のいずれかに記載の方法。
8. 脂肪酸シリンターゼ活性を阻害するタンパク質の発現を、
  - a. 前記患者から試料を得、
  - b. 当該試料中の前記タンパク質の量を決定する

CoAカルボキシルーゼ、クエン酸リターゼ及びリンゴ酸脱水素からなる群から選択される酵素の阻害剤である請求の範囲1～6項のいずれかに記載の方法。

19. 脂肪酸合成の阻害剤が脂肪酸合成を阻害するK<sub>i</sub>が10μM未満を示す請求の範囲18項に記載の方法。

20. 脂肪酸合成阻害剤が、1分当たり且つ200、000個の細胞当たり少なくとも10fモルのアセチルCoAを取り込むような脂肪酸合成活性を有する細胞による細胞増殖を阻害する1C<sub>50</sub>が10μg/mL未満を示す請求の範囲18項に記載の方法。

21. 前記患者が脂肪酸シリンターゼ(FAS)である請求の範囲18項に記載の方法。

22. 阻害剤がセルレニンである請求の範囲21項に記載の方法。

23. 前記患者がアセチルCoAカルボキシルーゼである請求の範囲18項に記載の方法。

24. 阻害剤が5-（アクトニルオキシ）-2-フランブ酸(TOF A)である請求の範囲23項に記載の方法。

25. さらに、脂質合成の阻害剤を脂肪酸合成の阻害剤と共に共に投与する請求の範囲1～6項のいずれかに記載の方法。

26. 脂質合成の阻害剤がトリアシンC(Triacsin C)である請求の範囲22項に記載の方法。

27. 内因的に合成される脂肪酸に依存性の動物細胞増殖の増進を阻害する方法に使用するための脂肪酸合成の阻害剤を含有する組成物の製造法であって、前記組成物を細胞増殖に当該細胞増殖の増進を阻害するに足る量で投与することを含む前記方法。

28. 1分当たり且つ1μgタンパク質当たり少なくとも10fモルのアセチルCoAがアシルグリセリドに取り込まれるような脂肪酸合成活性を示す動物細胞増殖の増進を阻害する方法に使用するための脂肪酸合成の阻害剤を含有する組成物の製造法であって、前記組成物を細胞増殖の増進を阻害するに足る量で前記動物に投与することを含む前記方法。

工程により決定する請求の範囲3項又は4項のいずれかに記載の方法。

9. 前記試料が細胞増殖の試料である請求の範囲18項に記載の方法。

10. 前記試料が前記患者からの生体試料である請求の範囲8項に記載の方法。

11. 前記決定工程が試料ローアと前記タンパク質をコードするmRNAとの間のハイブリダイゼーションを検出することをさらに含む請求の範囲8項に記載の方法。

12. 前記判定工程が、前記タンパク質を発現する細胞増殖を前記タンパク質と抗体との間の結合を検出することを含む請求の範囲8項に記載の方法。

13. 脂肪酸シリンターゼ活性を示す前記タンパク質が、leu ty ser gly asn asp val thr asp ile se f asp asp arg ohc pro ile pro e1 u lig ala asn rly val glu pro lo u ohc arg lvr e1n cyoのアイノ酸配列を有するポリペプチドと免疫学的に交叉反応性であるエヒトープをもつ請求の範囲3項又は4項に記載の方法。

14. 正常細胞の脂肪酸シリンターゼ発現を減少させる工程をさらに含む請求の範囲1項～第6項のいずれかに記載の方法。

15. 脂肪酸シリンターゼ発現を減少させる工程が前記患者のカロリ摂取を減少させることを含む請求の範囲14項に記載の方法。

16. 脂肪酸シリンターゼ発現を減少させる工程が異相細胞増殖又はアシルグリセリドを含有する組成物を前記患者に投与することを含む請求の範囲14項に記載の方法。

17. 異相細胞増殖又はアシルグリセリドを含有する組成物が前記患者に必須脂肪酸を供給する請求の範囲16項に記載の方法。

18. さらに、脂肪酸合成の阻害剤が、脂肪酸シリンターゼ、アセチル

29. 脂肪酸シリンターゼ活性を示すタンパク質を発現する動物細胞増殖の増進を阻害する方法に使用するための脂肪酸合成の阻害剤を含有する組成物の製造法であって、脂肪酸合成の阻害剤を細胞増殖の増進を阻害するに足る量で細胞増殖に投与することを含む前記方法。

30. 脂肪酸シリンターゼ活性を示すタンパク質を発現する細胞増殖を有する動物細胞増殖の健康を改善する方法に使用するための脂肪酸合成の阻害剤を含有する組成物の製造法であって、治療有効量の前記組成物を当該患者に投与することを含む前記方法。

31. 外因性の脂肪酸を利用することがない動物細胞増殖を含む組織をもつ患者の組織の健康を改善する方法に使用するための脂肪酸合成の阻害剤を含有する組成物の製造法であって、脂肪酸合成の阻害剤を細胞増殖に投与することを含み、この阻害剤の量は前記細胞増殖による細胞増殖の増進を阻害するに足るものである、前記方法。

32. 外因性の脂肪酸利用できない患者の生殖細胞を致す方法に使用するための脂肪酸合成の阻害剤を含有する組成物の製造法であって、前記細胞増殖による脂肪酸の合成を阻害するに足る量の脂肪酸合成阻害剤を当該患者に投与することを含み、この阻害剤の量は前記動物を致さないような量である、前記方法。

33. 前記患者が乳癌、膵臓癌、肺癌、大腸癌、及ぼ前立腺癌からなる群から選択される癌を有する請求の範囲27項～第31項のいずれかに記載の方法。

34. 脂肪酸シリンターゼ活性を発現するタンパク質の発現を、
 

- a. 前記患者から試料を得、
- b. 当該試料中の前記タンパク質の量を決定する

工程により決定する請求の範囲29項又は第30項のいずれかに記載の方法。

35. 前記試料が細胞増殖の試料である請求の範囲34項に記載の方法。

36. 前記試料が前記患者からの生体試料である請求の範囲34項



細胞の生育を抑制し、一方、脂肪形成誘発剤を低減させる正常の脂肪細胞の増殖とを抑制し、MCF-7、2R-75-1およびT-47Dのようなプロゲステロン受容体（PR）に陽性のヒトの脂肪がん細胞では、プロゲステロンが生育を阻害して、他の脂肪形成誘発剤とともに脂肪細胞シグナルを生成を抑制させる（Chambers, J. Steroid. Biochem., 32: 815-922, (1989)）。プロゲステロンは、おそらく、ラットの脂肪細胞シグナルセグロエータ一中に見られるようなステロイドホルモンの反応因子を経て脂肪細胞シグナルを増大させるように働き（Amey, Biochem. J., 271: 675-686, 1989）、FAS mRNA発現の増大をもたらすか、または他の機構により、メセーの安定性の向上をもたらす（Joyeux, Mol. Endocrinol., 4: 681-686, 1989）。PRに陽性のヒトの脂肪がん細胞に関しては、唯一つの研究は、脂肪細胞シグナルがSKBR3細胞中のサイトゾールシグナルの25%を占めることを報告しているが、その生物学的意義または細胞に關するデータは得られていない（Thompsonら, Biochim. Biophys. Acta, 662: 125-130, 1981）。

サイトカインや他の脂肪形成ホルモンの関与は、ヒトの脂肪がん細胞に關するごく僅かなデータしかない。たとえば、TNFはある種の脂肪がん細胞系に対して、著しく生育を阻害することが知られている。TNFは主要なラットの肝細胞癌細胞に対しては腫瘍やみに生育を阻害するが（Dunn, 6000単位/m<sup>2</sup>）、MCF-7のようなある種のヒトの脂肪がん細胞は生育が極めて阻害される（1D<sub>5</sub>=4.0単位/m<sup>2</sup>）（Chapker, Exp. Cell. Res., 185: 247-257, 1989）。しかし、脂肪がん細胞中のFAS発現または脂肪形成活性に対するTNFの効果は、いまだ不明である。Northern分析を用いる、MCF-7細胞中の脂肪細胞シグナル発現の1つの研究は、インスリンおよびインスリン感受因子-1が、プロゲステロンの場合に現れる5-10倍の増大と比較して、僅か相対的であったにすぎず、一方T<sub>4</sub>は効果的であったことを認めた（Chambers, J. Steroid. Biochem.

m. Mol. Endocrinol., 43: 223-225, 1989）。概して、受容体に陽性の脂肪がん細胞中のFASの発現が大まかに調べられたにすぎず、一方受容体に陽性の脂肪がん細胞は抑制された二つのシステムでは、脂肪がん細胞または他のがん細胞に對して、乏しい臨床効果との関連は認められなかった。FAS発現と予後との関連をせよとすると唯一の研究では、脂肪細胞シグナル受容体、27種の脂肪がん細胞におけるその位置での腫瘍形成によって研究し、脂肪細胞シグナルセグロエータ増大と著しい脂肪細胞分化との関連を見出したが、エストロゲンまたはプロゲステロン受容体活性との関連はなかった（Chambers, J. Natl. Cancer Inst., 82: 602-606, 1990）。これらのデータから、脂肪がん細胞中の脂肪細胞シグナル受容体は著しい脂肪細胞分化と関連があり、したがって、恐らくあまり重要でない腫瘍とも関連するであろうと推測された。

脂肪細胞シグナルセグロエータ発現と若年層（更年期前の患者）との関連を認めたが、またしても、受容体活性との関連は認められなかった（Wicker, Anticancer Res., 10: 1549-1552, 1990）。いずれの研究も、患者の臨床的検査は行わず、FAS発現と無差別期間または患者の生存率とを比較するデータもなかった。腫瘍的進展なしには、FAS発現と腫瘍の悪性との關する情報における結論を導き出すことはできない。

これらの研究は、いくつかのセクターからの200例以上の患者の系列とは著しく異なり、無差別生存率よりも特定の生存率の測定によって、詳述しない予後と腫瘍が関連していないシグナル質（Q<sub>A</sub>-519と呼称）の研究との間の強い関連性を示している（Kumajda, N. Engl. J. Med., 321: 636-641, 1989; Shurba, Am. J. Clin. Pathol., 93: 238-242, 1991; Corfian, Am. J. Clin. Pathol., 96: 406, 1991; Cotler, Lab. Invest., 68: 13A, 1992; Ziegler, Am. J. Clin. Oncol., 14: 101-110, 1991）。

脂肪細胞がん細胞の研究目標ではなかった。Fujiiら（1986, Jap. J. Exp. Med., 56: 99-106）は脂肪細胞系に対する脂肪細胞の増殖を、脂肪細胞系によって増大させようとして、脂肪細胞を認めるために、外因性抗腫瘍剤と組合せて脂肪細胞シグナル阻害剤のセルレニンを使用した。セルレニンが、脂肪細胞に對して陽性であることは公知であった。Fujiiらは、さらに、セルレニンの腫瘍を、腫瘍が抑制する細胞リソースの体系に免疫のある成分によって与えられる選択率を維持するほど低く抑える必要があることを観察した。SP1e1v0e1らは米国特許第5,143,907号で、一種のホスファイトーガラクトシドが抗腫瘍効果ならびに抗免疫効果を示す一方血清コレステロールおよび血漿トリグリセリドを減少させることを指摘した。ホスファイトーガラクトシド化合物は多くの細胞機能に影響を及ぼす非特異性の阻害剤であり、したがって、脂肪細胞に對して選択的に影響を及ぼすものではない。SP1e1v0e1らは、血清コレステロールおよびトリグリセリドに及ぼす脂肪低下効果は2つ以上の機構によって促進され、したがって非断発物的効果の脂肪低下活性との関連は認められなかったと報告した。

この発明の目的は、患者の腫瘍の苦しみを軽減させるがん腫瘍の治療法を提供することにある。この発明の別の目的は、悪性がん細胞の治療法を提供することにある。この発明は、がん細胞に對して、選択的に、毒となるが、または増殖を抑制するように細胞生育を阻害するように、がん腫瘍に對する脂肪細胞系を阻害することによるがん腫瘍の治療法を提供する。より特異的な腫瘍では、この発明は、腫瘍となる化学治療法として、脂肪細胞シグナルセグロエータ阻害剤、または脂肪細胞系を抑制の他の腫瘍の阻害剤を投与し、それにより、腫瘍の苦しみを和らげることによってがん腫瘍を治療する方法を提供する。

この発明では、この発明は、患者に治療上有効な量の脂肪細胞シグナルセグロエータ阻害剤を投与することを確認とする。脂肪細胞シグナルセグロエータ質を投与す

る腫瘍組織を有するがん腫瘍の腫瘍の苦しみを和らげる方法を提供する。発現は、バイオジェン、切替またはニールホルムのような方法で得た組織試料について、免疫組織化学、サイトゾール酵素免疫検定法もしくは放射免疫検定法のような検定方法を用いて脂肪細胞シグナルセグロエータを検知するかまたは腫瘍活性の直接測定によって、直接腫瘍組織中で測定することがである。腫瘍による脂肪細胞シグナルセグロエータの発現は、酵素免疫検定または放射免疫検定のような検定法を用いて、ブラスマまたは液体中の脂肪細胞シグナルセグロエータを検知することによって、間接的に測定することができる。

他の機構では、この発明は、治療上有効量のFAS阻害剤の投与前および/または投与中に、正常細胞のFAS腫瘍活性を低下させることによって、広範囲にわたって、正常の（非断発物的）組織（たとえば正常に脂肪細胞シグナルセグロエータを産生する肝臓）を腫瘍的毒性から保護しながらがん腫瘍患者を治療する方法を提供する。この受容体減少は、たとえばカロリー摂取の低減または他の適切な方法によって行うことができる。

本発明者らは、脂肪がんや他のがん腫瘍で発現するタンパク質（Q<sub>A</sub>-519と呼ぶ）の予後の重要性を発見した。とくに、悪性がん腫瘍は、とりわけ、Q<sub>A</sub>-519を発現する腫瘍を要する傾向があり、この特定タンパク質は、がん腫瘍の成長にとって必要な腫瘍活性であるように思われるが、正常の細胞にとっては必ずしも必要ではない脂肪細胞シグナルセグロエータ活性を有することが認められた。本発明者らは、脂肪細胞シグナルセグロエータ阻害剤（FAS阻害剤）がQ<sub>A</sub>-519を発現する細胞に對して陽性であることを発見した。これらの発見に基づいて、本発明者らは、脂肪細胞系を治療するとして、患者の腫瘍の苦しみを軽減することによるがん腫瘍患者を治療することの発明の方法を開発した。この発明の方法は、FAS阻害剤のような阻害剤による治療が脂肪細胞シグナルセグロエータを発現する細胞に選択的であるためにとくに有利である。FASは、通常、正常細胞によって発現される。したがって正常細胞が阻害剤によって選択的に作用される破壊可能な腫瘍である。

図1は、脂肪がん細胞におけるQ<sub>A</sub>-519発現と生存率との関係を示す。

図1 Aは、胸腺がんにおけるQ A-5 1 9 発現とプロゲステロン受容体 (PR) との相関を示す。

図2 Aは、前立腺がんにおけるQ A-5 1 9 発現と細胞増殖率との相関を示す。

第2 B図は、乳癌がん組織におけるQ A-5 1 9 発現と予後との相関を示す。

第2 C図は、ポリテトラフルオロエチレン膜製法による胸腺がん組織からのQ A-5 1 9 の段階的増大および増大の増大の段階におけるタンパク質の対応するWestern blotを示す。

第3 A図は、Q A-5 1 9 と免疫学的に交差反応を示すペプチドの34-アミノ酸配列を示す。この配列は、Maeeda, J., D. I. O. I., Ch. M., V. O. I., 260, P. D., 6698-6709, 1985によって報告されたH. P. E. 遺伝子によりコード化された最初の34のアミノ酸に相当する。

第3 B図は、Q A-5 1 9 のペプチド配列分析を示す。

第4図は、Q A-5 1 9 がマウスセルおよびマウスC O A から脂肪腫を形成することを示す。

第5図は、セルレニンがQ A-5 1 9 脂肪腫シグナルを阻害するD i x o n プロットを示す。

第6図は、セルレニンががん細胞の生育を阻害するが、正常の細胞に対しては生育を阻害しないことを示す。

第7図は、Q A-5 1 9 誘発活性が増すにつれて、セルレニンの阻害が向上することを示す。

第8図は、F A S 発現とアシルグリセリド合成との相関を示す。

第9図は、F A S は配列を有するリポプロテインの位置での細胞形成による腫瘍細胞系におけるQ A-5 1 9 の発現の増加を示す。

第10図は、免疫組織化学的ステインによって検出されたQ A-5 1 9 の選択的発現を示す。

第11 AおよびB図は、セルレニンの、腫瘍の乳がん細胞系に対する相対的生育阻害を示す。

第1表 Q A-5 1 9 発現とがんの予後 (免疫組織化学による検定)

腫瘍組織	検出率	予後との相関	備考
肺癌	70 (第1および2期)	生存率 3.92 比較的位置	A
	135 (全期)	生存率 4.85 比較的位置	Martins
	49 (第1および2期)	早期 (2年) 再発 プロゲステロン受容体 との組合せ (p<0.02)	B
膵臓癌	42 (全期)	腫瘍グレード (p<0.006) 腫瘍容積 (p<0.004)	C
結腸	27 (全期)	遠隔転移 (p<0.02)	D
卵巣	34 (全期)	免疫組織 および生存率 (p<0.005)	Kachinski

- Kunojda, Y. *Engl. J. Med.* 321:634-41, 1989
- Cote, J. *Mod. Pathol.* 5:13A, 1992
- Shurba, J. *Am. J. Clin. Pathol.* 97:589-601, 1992
- Redston, J. *Mod. Pathol.* 5:47A, 1992
- 実験例1 抄録

本発明者らは、Q A-5 1 9 を分離して、分離したタンパク質が脂肪腫シグナル活性を示すことを確認した。ヒトの胸腺がん細胞系から純化したQ A-5 1 9 はマウスの脂肪腫シグナルとペプチド配列が相同であり、Q A-5 1 9 は、

第12 AおよびB図は、セルレニンの腫瘍がアシルグリセリド合成阻害とは相関するが、コレステロール合成阻害とは相関しないことを示す。

第13図は、細胞増殖速度とセルレニン阻害に対する感受性とは相関がないことを示す。

第14図は、前立腺がん組織に対するセルレニンの成育阻害を示す。

第15図は、高レベルの肉生的脂肪腫発生を伴う選択的乳がん細胞のT O P A による選択的生育阻害を示す。

第16図は、Q A-5 1 9 ... を発現する腫瘍細胞に対するT r i a c e i n のおおよそセルレニンの生育阻害効果を示す。

第17図は、外科的に検出された脂肪腫がF A S 阻害を伴って、セルレニンの成育阻害効果から細胞を解放することができるとを示す。

腫瘍の増殖率説明

1. 腫瘍に阻害する新しい誘発活性の発見

本発明者らは、第3 A図に示すペプチドには見られるが、ハプトグロビン1またはハプトグロビン2には見られないエドトープに特異的抗体と、とくに、免疫反応性があるタンパク質を発見し、またタンパク質が、もともと腫瘍の増大が腫瘍と高度に相関することを発見した。このタンパク質はQ A-5 1 9 と命名され、またこの明確なではQ A-5 1 9 ... と呼ぶ。いろいろのがん腫瘍の生育率に関する研究は、腫瘍の増大または増大中のQ A-5 1 9 の検出が不十分な予後とに統計的に高度の有意で相関することを示した。(第1表参照)

また脂肪腫シグナルの機能的特徴を有する。Q A-5 1 9 による脂肪腫形成は、脂肪腫中へのC A C 細胞増殖率A の増加、強く脂肪腫のエスチル化、および選択的クロマトグラフィによる分析によって確認された。腫瘍Q A-5 1 9 の特異活性は、アセチルコリン受容体A およびアセチルコリン受容体A の存在下で、340nm におけるN A D P H の酸化に付随して、分光測光法に測定された。1つの測定では、Q A-5 1 9 の特異活性は586ナノモルN A D P H /分/m g タンパク質と求められ、ヒトの肝臓からのF A S から得た404という値にかなり類似している。

脂肪腫シグナルは、肝臓および免疫系の細胞を含む特定組織からの腫瘍のサイトソーム中に存在する大きなタンパク質であるが、F A S はほとんど正常 (非悪性) の成人の組織では発現しない。高度生物中の脂肪腫シグナルは、単一分子で下記7種類の酵素活性を行うことが広く知られている多量体である (W a k i t . S . J . *Biochemistry*, 28:4523-4530, 1989)。

- アセチルコリン受容体
- アセチルコリン受容体
- ペプチドプロセッシング (結合阻害)
- ペプチドプロセッシング
- エノール化酵素
- チオエステラーゼ

胸腺がん細胞は脂肪腫シグナルを発現することが知られているが、大部分の他の腫瘍細胞は、この腫瘍の増大について関係していない。R o c h e f o r t および共同研究者は、胸腺がん細胞からF A S を部分クローン化して、胸腺がん細胞系によるF A S 発現が、プロゲステロンに対する反応性と相関性のあることを認めた (C h a i b o s s . J . *Biochem. J.* 262:9923-9926, 1987)。この証拠に基づいて、彼等は、F A S を発現する細胞は、増大が少なく、したがってあまり悪性がない腫瘍からのものであると結論した (C h a i b o s s . J . *Nat'l. Cancer Inst.* 82:

602-506, 1990).

本発明者らは、Rochefortの提示に反して、FAS活性を示すサブフラグであるQ A-519の存在は、もっとも毒性があるがん腫と極めて相関性があることを発見した。

本発明者らは、癌腫の体外培養阻害試験法を用いて、Q A-519の阻害剤ががん腫細胞の成長を阻害するが、正常のヒトの結核芽細胞に対してはほとんど効果がないことを実証した。実際は、FAS活性が極めて低い結核芽細胞は、高レベルのQ A-519活性を有する細胞ががん腫細胞の80%以上の生育を阻害するFAS阻害剤濃度に対する。多数の動物、樹立種、種、組織および細胞のがん腫細胞系ならびに正常の結核芽細胞に関する研究から、Q A-519シリンダー活性とFAS阻害剤による生育阻止との相関性が確認されている。阻害剤の低度とQ A-519阻害活性との関係は試験に供するあらゆる阻害剤の濃度範囲に適用できる。したがって、もっとも毒性のがん腫中で著しく増進する脂肪酸シリンダー効果の阻害は、これら癌腫中の癌腫の成長を阻害することができる。

#### B. 脂肪酸合成阻害に基づく効果

この発明は、腫瘍が、肉眼的に合成された脂肪酸（細胞内で合成された脂肪酸）に依存する細胞を含有するがん腫患者の癌腫の苦しみを軽減する方法を提供する。癌腫は、通常、FAS活性を有するサブフラグを増大させる。同記帳者の癌腫の苦しみを、患者に脂肪酸合成または利用を妨げる1種類以上の阻害剤を投与することによって和らげることができる。脂肪酸阻害剤は、FASを発現する癌腫細胞に対して毒性があり、癌腫による脂肪酸合成および利用の低減および/または該患者の生涯液中のFAS活性の低下をもたらす投与が癌腫の苦しみを軽減させる。

#### A. 癌腫患者の選択

この発明の方法は、高レベルの脂肪酸シリンダーを有するがん患者の苦しみを軽減するために用いられることができる。治療に適用可能な特定の癌腫には、肺癌、喉頭癌、皮膚がん、腎臓、子宮頸部内腫、子宮頸部外腫および癌、食道、上咽頭、中咽頭のがん腫または発芽細胞系がん腫、ならびに中皮腫がある。とくに、腎、子宮内腫、腎臓、肝臓および肺のがん腫または肺がんのみならず肺がんにもこ

定法は、癌腫またはブラスター中のQ A-519の免疫検定である。

FASの発現は、免疫組織化学、サイトゾール腫免疫検定または放射免疫検定、放射プローブとFAS配列を有するmRNA探針とのその位置での同種形成のような検定法を用い、もしくは非免疫活性の直接検定によって、生検、切除またはブラスター取りのような方法によって得た癌腫組織検定中で、直接測定することができる。腫瘍による脂肪酸シリンダーの発現は、通常の検定法を用いて、血漿、尿、唾液、リンパ液、唾液、汗液、涙水、またはとくにブラスターのような癌腫から得た生細胞検体試液中で測定に測定することができる。生細胞検体中のFASの好ましい検定法には、免疫検定または放射免疫検定法がある。

肉眼的に合成された脂肪酸に依存する癌腫は、また、腫瘍を包囲する非新生生物組織中に見られるよりも高レベルにある脂肪酸合成阻害剤の他の効果を告知することによって確認することもできる。とくに、手術でもねほと高レベルのブラスターC O Aカルボキシルーゼを有する細胞の培養は、この発明の意思図と一致である。これらの培養の存在は、FASについて述べた例証の方法と同様な検定法で検定することができる。

肉眼的に合成された脂肪酸を必要とする癌腫は、がん腫、とくにもっとも毒性のがん腫の中に広く分布している。腫瘍前にFASの存在を調定することは好ましいけれども、熟練した腫瘍師は、その確認が必要しも必要ではないことを認めている。脂肪酸合成阻害剤、とくに、癌腫の苦しみの軽減をもたらすFAS阻害剤によるがん腫患者の培養は、腫瘍中にFASの存在を示す。この発明の方法によってがん腫患者をうまく治療できれば、別にFASの存在は不要となり、FASを抑制させるために通常見出されるようながん腫のこのような実験的治療法も、この発明の意思図する範囲にある。

脂肪酸合成阻害剤は、他の化学療法薬と組み合わせても有効である。現在処方されているがんの化学療法薬は、脂肪酸シリンダー供給に対してとくに活性ではないので、FAS阻害剤は、現在の抗がん剤、とくに他の同化または異化経路を抑制する代謝阻害剤を補充する。

FAS発現と脂肪酸合成経路の阻害剤の生育阻止効果とは癌腫の阻害とは無関係

この発明によって治療可能である。肺癌、肺腫および癌腫、腎臓ならびに癌腫は、この治療を行うのにとくに適する癌腫の腫がんである。

この発明の方法は、FASを発現するか、または肉眼的脂肪酸（細胞内で合成される）に依存する癌腫を有する癌腫の癌腫を調定している。癌腫による肉眼的脂肪酸合成は、癌腫200、000個当り部分、アミノグリセリド中に107μモル（以下、μモルと略すことがある）以上のアセチル-Co Aを包含させる濃度で行われるのが好ましい。好ましい患者は、Q A-519またはアセチルCo Aカルボキシルーゼ（ACC）のような脂肪酸合成阻害剤の他の効果を調定する癌腫を含有する癌腫、腫瘍の正常な（たとえば非新生生物性）組織中に見られるレベルよりも高いレベルで育っているために、癌腫を区別することができる。癌腫は攻撃的な癌腫で予て、生育率の減少、転移の増大、臨床的再発速度の増大および阻害的な阻害剤をもちあす。

脂肪酸合成阻害剤に対する癌腫細胞の感受性は、通常、FASのレベルとともに変化する。癌腫200、000個当り、部分207μモル以上のアセチルCo Aを脂肪酸に包含させるFAS活性レベルを調定する攻撃的な癌腫細胞は、脂肪酸シリンダー阻害剤に対して敏感であると考えることができる。多くの癌腫細胞は肉眼的脂肪酸合成に著しく依存するので、低FAS活性レベルは、脂肪酸シリンダー阻害剤による治療法の候補者として特定の癌腫を除外する必要はない。

がん腫細胞中のFASの存在は、活性癌腫またはブラスター、低FAS活性を用いる免疫検定、FAS mRNAを測定する検定法等を含む一般的な方法によって検定することができる。とくに好ましいものは、J.D.I.遺伝子の遺伝子産物と免疫的に交互反応性があるが(Mead et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, pp 698-6709, 1985)、ヘアトプロビニまたは2とは交互反応性がないサブフラグのQ A-519を存在させる検定法である。免疫検定法はInterneal Patent Publication WO 90/08324または米国特許公開07/735, 522号に記載されており、いずれも参考資料としてこの明細書に記載してある。もっとも好ましい検

保である。したがって、脂肪酸合成の阻害剤は、急速に増殖する癌腫を抑制とする化学療法薬と組合せると、とくに効果的であると期待することができる。とくに、脂肪酸合成阻害剤は、治療する特定の癌腫の癌腫に対して有効であることが判明している抗腫瘍剤を基調とする化学療法による癌腫を抑制するものに投与することができる。とくに、未検知ではあるが、極めて悪性の癌腫の大部分の生育を防ぐために、他の薬剤を用いる治療計画とともに、脂肪酸合成阻害剤を用いることはこの発明の意思図する範囲にある。

一例、脂肪酸合成阻害剤が、抗体によって調定されるにせよ、または細胞活性化の別の経路によって開始されるにせよ、癌細胞群によって細胞媒介癌腫の癌腫を生じさせる薬剤と組合せると有効であるとは考えられない。(Bhaskara et al., 1983), "Membrane Damage by Complement", Biochim. Biophys. Acta, 737: 343-372). したがって、この発明は、癌細胞群が癌細胞を活性化させる外因的に供給される薬剤の存在下における脂肪酸合成阻害剤の使用に関するものではない。

#### B. 脂肪酸合成経路の阻害

それ自身の肉眼的に合成された脂肪酸に依存するがん腫細胞はFASを調定する。これは、FAS阻害剤が癌腫を阻害するという事実ならびに外因的に供給された脂肪酸は、FAS阻害剤から正常の細胞を保護することからである。がん腫細胞は保護できないという事実によって証明される。このように、癌腫による脂肪酸合成の阻止をがん腫の培養に用いることができる。

脂肪酸合成阻害剤（アセチルCo A、アセチルCo AおよびNADPH）を用いて、脂肪酸シリンダー（FAS）によって合成される。したがって、脂肪酸合成経路は、通常、4種類の酵素を含むと考えられる。FASおよび基質を生成する3種類の酵素：アセチルCo Aカルボキシルーゼ（ACC）、リンコ酸酵素およびクレブシアン酸。ヘキソースモノホスファート分岐を経てNADPHを生成する酵素のような、癌腫内に基質を送り込むことができる他の酵素も、脂肪酸合成速度に影響を及ぼし、したがって肉眼的に合成された脂肪酸に依存する癌腫内で癌腫となるかも知れない。これらの酵素の阻害または活性の阻害は肉眼的に合成さ

れた脂肪酸に依存するがん細胞の生育に影響を及ぼす。この発明によって、がん細胞による脂肪酸合成を阻害する適切な方法は、とくに、癌腫の4種類の癌の活性の阻害剤を含めて、がん癌患者の癌痛の苦しみを軽減させるのに用いることができる。

FASの生成物は癌腫のC<sub>11</sub>-C<sub>16</sub>脂肪酸、通常パルミチートである。パルミチン酸は、細胞の種々の脂質成分の要求を満たすために、さらに飽和されなければならない。この明開書で使用する「脂質生合成1」という用語は脂肪酸合成または純く脂肪酸飽和において預われ、脂肪酸生合成飽和成分をつくる1工程または工程の組合せを指す。この下流の飽和の第1工程は酵素（アシルCoAシンターゼ）によって触媒される脂肪酸と飽和炭素Aとのカブリンタによる脂肪酸の活性化である。

脂肪酸の下流の飽和または利用における重要な段階の阻害は、細胞が内因性脂肪酸に依存するにせよ、また細胞外から供給される脂肪酸を利用するにせよ、細胞の機能を阻害することであり、したがって下流工程の阻害剤は、内因性脂肪酸に依存する癌細胞に対して、十分に阻害的でないかもしれない。しかしながら、該細胞に対する脂肪酸合成阻害剤の投与が、細胞を、阻害剤による下流の脂肪酸の飽和および/または利用の阻害に対してより一層敏感にすることが発見された。この相乗作用によって、脂質生合成および/または利用における下流工程の1個以上阻害剤とともに脂肪酸合成阻害剤を投与することは、内因的に合成された脂肪酸に依存する癌細胞に選択的に影響を及ぼす。好ましくは組合せには、FASまたはACCの阻害剤と組合せたアシルCoAシンターゼの阻害剤がある。

### C. 脂肪酸合成の阻害剤

FASを発現する癌腫が癌腫にあることがはっきりしたとき、またはがん癌患者の生理的液体中にQ A-519が発見された場合には、癌患者は、この発明の方法により、脂肪酸合成阻害剤を癌腫に投与することによって治療することができ、癌与がこの発明の意図する癌とちうにある阻害剤は、細胞による脂質生合成または利用を明らかに阻害することが認められる化合物を含むことができる。

は混合物の成分阻害剤の濃度に影響されやすい。非癌性細胞およびQ A-519を発現する細胞に対する特定混合物の効果の比較による個々の成分濃度の最適化は癌腫に癌腫にとってはおそらくった問題である。治療効果を高めるに必要な個々の成分の用量は、癌腫の調剤法により、個々の成分の薬理学的考慮して求めることができる。

脂肪酸合成の阻害剤、または阻害剤の相乗的混合物は、治療する癌腫を死滅させると思われるレベルを下回るレベル（用量および治療期間に基づいて）を投与する。投与は生体器官を回復できないほどには低くないレベルが、または、肝臓機能、胃腸機能、心臓機能、腎臓機能、尿系排泄機能、外分泌機能、脂肪骨髄、または神経学的機能の恒久的低下をもたらさないレベルが好ましい。一方、若干の細胞を死滅させるが後に再生させる（例、子宮内癌細胞）レベルの阻害剤の投与は必ずしも除外されない。

アセチルCoAカルボキシラーゼおよびFASの結合酵素は、たぶん癌腫の候補者となる。脂肪酸合成は、これらの酵素の阻害剤によって阻害または停止するとと思われる。その結果は脂肪酸の欠陥になると思われる。それが細胞を死滅させるであろう。しかし、正常の細胞は補填する脂質を移入させることができるので、生き残ると思われる。アセチルCoAカルボキシラーゼは脂質生合成を調節する中心である。FAS結合の結合酵素は、増殖および機能の点から十分に調節され、その活性中心は、セルレニンのような脂質合成酵素の類似となる1種の重要なシステイン酵素を含む。

種々の化合物が、脂肪酸シンターゼ（FAS）を阻害することがわかっており、がん癌患者の治療に適切なFAS阻害剤を選択することはこの分野の通常の研究者の熟練の範囲内にある。FAS阻害剤は、純粋酵素を用いて、脂肪酸シンターゼ活性を阻害する化合物の能力を試験することによって確認することができる。脂肪酸シンターゼ活性はNADPHの酸化に基づいて分光学的に測定するか、または純粋アセチルまたはアロニルCoAの割合を測定することにより放射能によって測定することができる（Dill et al., *Mol. Cell. Biochem.* 1995; 74-83）。適切なFAS阻害剤は、たとえば第2表に例示するものか

脂肪酸合成を阻害する化合物は、癌細胞の生育を阻害するために使用することができ、いうまでもなく、癌者に投与する化合物は癌性細胞および正常な（癌でない）細胞のいずれにも等しく毒性があらってはいない。この発明の方法に用いるのに好ましい阻害剤は増殖指数が高い阻害剤である（増殖指数とは正常な細胞に影響を及ぼす濃度対照癌細胞に影響を及ぼす濃度との比のことである）。治療指数の高い阻害剤は、1つは正常な細胞系（癌細胞系のような非癌性系、および1つは癌細胞のQ A-519を発現することによって阻害されているがん癌細胞の2つの細胞系）に及ぼす阻害剤の効果を比較することによって確認することができる。とくに、治療指数は、低レベルの、好ましくは細胞200、000個当たり約10<sup>3</sup>アロニル以下のアセチルCoAをアシルグリセリド中に包含させる脂肪酸合成活性を示すヒトの細胞系のような動物細胞の生育阻害を、高レベルの、好ましくは細胞200、000個当たり毎分20<sup>3</sup>アロニル以上、より好ましくは少なくとも約80<sup>3</sup>アロニルモルのアシルCoAをアシルグリセリド中に包含させる脂肪酸合成活性を示すヒトのがん細胞の生育阻害と比較することによって決めることができる。好ましいレベルの脂肪酸合成活性を示す細胞は癌細胞研究によって癌腫に導かれ、公的に入手可能な癌細胞の例は該記載文献7に示してある。癌阻害剤は、細胞増殖に知れた外因性脂肪酸、たとえばB Aと結合をつくらせ、5 mMオレイン酸を存在させて行うのが好ましい。

阻害剤は、細胞の生育を50%だけ阻害するのに必要な濃度（IC<sub>50</sub>またはID<sub>50</sub>）を特性とすることができる。たとえば高治療指数を有するFAS阻害剤は非癌性細胞に対するIC<sub>50</sub>よりも低濃度（IC<sub>50</sub>により測定して）でがん細胞の生育を阻害する。これら2種類の細胞に対する効果が大きな差を示す阻害剤は好ましい。脂肪酸合成の好ましい阻害剤は、脂肪酸合成活性の高い細胞に対して、活性の低い細胞の場合に測定される阻害剤のIC<sub>50</sub>よりも、少なくとも1<sup>6</sup>倍、より好ましくは少なくとも1<sup>8</sup>倍小さいIC<sub>50</sub>を有する。

少なくとも1つの脂肪酸合成阻害剤と、脂肪酸合成酵素に癌腫を誘発する癌腫または脂肪酸の下流の飽和および/または利用の飽和となる酵素の少なくとも1つの阻害剤との相乗的効果の投与によって癌腫を治療する場合に、治療効果

ら選ぶことができる。

### 第2表 脂肪酸合成経路の酵素の代表的な阻害剤

#### 脂肪酸シンターゼの阻害剤

1. 3-ジプロモプロパニル E 111 man 試験 [5, 5] - ジチオヒス(2-ニトロアミン酸), DTNB
- 4- (4'-クロロベンジルオキシ) ベンジルニコチン (KCD-232)
- 4- (4'-クロロベンジルオキシ) 安眠薬 (M4)
- 2 [5 (4-クロロフェニル) ベンチル] オキシラジ-2-カルボキシレート (POCA) およびそのCoA誘導体

エトキシ水溶液  
チオラクトイジン  
セルレニン

メラルソロール  
コトアセチン  
フェニルアルシノキシド  
ベンチル  
メリチン

#### メチルCoAシンターゼの阻害剤

##### 2-エチルアセチン

- (一) ヒドロキシトレート (R, S) -S- (3, 4-ジカルボキシ-3-ヒドロキシ-3-メチル-2-チル) -CoA

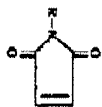
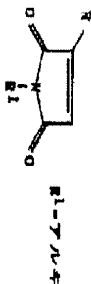
#### S-カルボキシレトメチルCoA

##### アセチルCoAカルボキシラーゼの阻害剤

ヒトキニジン  
ハロキニジンおよびそのCoAエスチル  
ジクロホクアおよびそのCoAエスチル  
クレトジン







R基のチールは、Morisakiら (Eur. J. Biochem. 211, 111 (1993)) の報告によれば、多様に行うことができる。鎖長の長さを延ばしてもまた短くしても阻害効力は低下する。チトラヒドロセルレンは、セルレンよりも80-150倍効力が高い。この結果は、鎖中のπ電子が結合において重要であるという考えと一致する。またトランス二重結合は、これも重要であるかもしれない配座の特性を与える。

この発明の別の態様では、アセチルCロAカルボキシラゼまたはリソソ酸阻害またはアセチルアゼを阻害する化合物を投与することによって、がん腫患者を治療する。これらの阻害剤の代表的な阻害剤を第2表に示す。特定の阻害剤選択の考察は前記のP.A.S阻害剤の場合と同様である。

アセチルCロAカルボキシラゼの検定法は、この明細書に収録した米国特許第5,143,907号に教示されており、検定法は、熟練技術者が用いて、属知の手段でA.C.C阻害剤の組成定数を求めることができる。



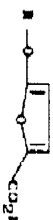
フルアジホップ



ジクロホップ



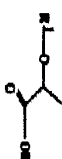
ジクロルアロップ



アロパノエート類のいくつかの同族体は良好な阻害剤である。1例はT.O.F.A.5 (チトラヒドロセルレン) -2-エノ酸で、効力のあるアセチルCロAカルボキシラゼ阻害剤である。構造を下記に示す。

この場合のC-2はキラルではない。R基は置換体で炭素が14個の置換基である。この発明によってこれらと置換されるこの化合物および関連化合物は、この明細書に収録した米国特許第4,146,623号に教示されている。アロパノエート類の同族体の別の例はT.D.C.A.すなわちチトラヒドログリシド酸である。

本発明の生物からのアセチルCロAカルボキシラゼを阻害するアロパノエート類は好ましい阻害剤である。該阻害剤は下記の構造式によって表わすことができる。



Rは水素、アルキルまたはアリールであることができる。不斉炭素原子における配座はR、S、またはランダムであることができる。置換中のアセチルCロAカルボキシラゼは、R同族体には限らないことが多い。R'はアリール-オキシ-アールのことが多い。



芳香族類はベンゼン、ピリジン等であることができる。芳香族類のハロおよび他の置換基はさし支えない。アロパノエート類の例を下記に示し、かつ/または第2表に挙げる。

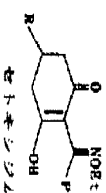


脂溶性およびエーテル性炭素に対してβ-位のカルボキシル炭素が共通した構造の特徴である。他の関連する2-置換アロパノエート類にはアトロアロペン、アトロキサムおよびそれらの同族体のような化合物がある。



アトロアロペン  
R = イソブチル

アトロキサム  
R = イソブチル



セトキシム

ケトシクロヘキセン類は別の種類のアセチルCロAカルボキシラゼ阻害剤を表わす。1例はセトキシムである。

式中、Rはエチルチロピロピル基である。アセチルCロAカルボキシラゼを阻害する別の種類の化合物は、下記一般式で表わされる。



東坡先生集

O.A. 5.19 の結果は、乳脂の産生における減少した生付率と前立腺癌と卵巣癌の同時における減少した生付率に直接に関連する。

茲に參考として引用する國藥特許出願公開WO 90/0832.4又は米國特許出願番号07735,522の實例7は、乳糖におけるOA-519の含量が増加した母乳の時薬と関連していたことを証明した。臨床的研究は、OA-519の含有量が低下した母乳と乳糖の含有量においては減少した全体的生存率と、所屬種の健康においては母乳の無い生存率と関連することを検証する。

## 丸屋の蘭物

患者の人口凡額を持つ135人の婦人の追跡調査開始の任意団体の仲間(最初の外科的治療の時点で研究費に入会した患者)の身元がNorton Hestonの調査記録によって確認された。此れから婦人の全額は主に関連性の電柱の乳癌の調査のために乳野切術の治療を受けた人々であった。患者の平均年齢は52歳で、それは32歳から72歳の範囲に亘った。平均の追跡調査期間は12.3年で、その範囲は10年から16年であった。患者は、外科手術後の治療の記録、死因、生存期間、主癌腫瘍の病理アンプルが各患者帳簿に利用できるようにになった時に研究費に入会する権利を与えられた。エストロゲン(卵巣ホルモン)とプログステロン(黄体ホルモン)のリセプター(受容体)の情報も免疫組織化学的に決定された。更に、患者の年齢、商品の致育量と化学療法、放射線治療、及びホルモン療法のための文書に記録された。遺伝性の因素と複製遺伝子の関連の考察が、同じくFisherの判定基準を用いて決定された(Fisher, Cancer, 46巻: 908-918頁1980年)。

OA-519に対する免疫組織化学的染色:

免疫組織化学的な染色には、マリーランド州、ロックビル、パークローブ・ド  
ライヴ 12301番地の American Type Culture Collectionに1991年、  
7月26日にATCC7727と番号HB 10853の下に預託されたOA-511

Home(バージニア州)のメヂカルセンターのフナールから選ばれた。研究集団には米国産炭酸ナトリウム(ＡＵＳ)の設備に１つの独立設備の９人の者が含まれていて、臨床試験の情報は臨床試験の契約または臨床記録の再調査から得られた。研究から除外された患者は、検査の時に彼らが離れて施設に居て転移(ＡＵＳの設備で２)を持っていたか、最後の追跡調査で彼らの状態が未知であったか、又は全追跡調査の期間が２年以下であった人々であった。

## 組織心理学の研究

紙は随時の増減付け、組織標本の全てを見出し、二つの支配的なパターンに對する数を加えることによって Gleason の修改を決定した (Gleason, Tannenbaum & Mead): Urologic Pathology: 前立腺、Pharyngolarynx、1888年、Lee を F. Abinger, 1771~1938年)。段階 I には Gleason の得点は 2 ~ 4、段階 II には 5 ~ 7、段階 III には 8 ~ 10 が割り当てられた。

## 免役の組織に学的研究：

免疫組織化学的な染色の為に各種から代表的な組織のプロックを一つ選んだ。免疫組織化学の研究に適用したO-5-19に対してラビビットの血中に溶けずらた顆粒と精製したポリクローナル抗体を此の研究に適用した。自然的な方法で乾燥した、ホルマリンで固定し、パラフィンを含む塊に埋めて染色を行った。標識を付けない一次抗体を利用したラビビット・ヒオキチン抗体(A.B.C)の免疫・ヒオキシンダーゼの技法を使用した。簡単に言うには、内因性のペルオキシダーゼ活性の他に非特異的なロウチン結合能力を持つ細胞の切片を20分間培養した。次にヌトラドをP.B.S中で27 mg/ml、pH 7.2、室温で1時間、緩やかに精製したポリマーをつけて、引き続いてP.B.Sの中で恒温浸漬した。途中、P.B.Sによる洗浄を介在させて、引き続きP.B.Sの中

に1:2,000に希釈したヒオキシン化したヌトラの抗ラビビットの免疫グロブリンはアビジン・セリコグラフィのペルオキシダーゼ抗体でvisualize (登録商標名 Vector Laboratories)を用いて、両方とも22℃で30分間、切片を恒温培養した。Mixerのペルオキシニンにより対比染色と一緒にクロムゲン(色原体)とし

9-M1又はHPR-2と名付けられたハイブリドマー(融合細胞産物)からのモノクローナル抗OXA-519の抗体を使用した。

[illegible]

OA-519の免疫反応性と毒性の判定基準

酸性染色は概かゝ程度の濃度で充分一貫性のものであった。而して、染色は固着剤の100倍の倍率で可成であるが、又は固着と称せられる場合には固着剤の10%で濃縮付けするかの所からでなければならなかった。

OA-518の免疫原特性の予後の重要性

O.A.-5.19に対して陽性に染色された腫瘍の患者は、乳癌で死にする者しく  
 増殖された腫瘍を持っていた。図1はO.A.-5.19に陽性の患者と陰性の患者の  
 運命を要す生命表である。例え、12年頃には、O.A.-5.19陽性の患者の大  
 凡そ15%が死にいたのと比較してO.A.-5.19陰性の患者はその約37%が死  
 じた。

次の表は段階的なO A - 5 1 9反応性の重要性を示す：

	段階 1	段階 2	段階 3
	%死亡率	%死亡率	%死亡率
OA-519+	9/13(70%)	27/37(87%)	9/9(100%)
OA-519-	3/20(15%)	16/41(39%)	12/21(57%)
P-値	0.002	<0.0001	0.019

商立地の面積によるOA-519の推定

創立以来における O.A. 519 の発展も同じく新気の再興と関連することが見出された。創立以来と診断され、そのための治療を受けた患者が、McConnell

でアミノエチルカルバゾール(AEC)(Vector Laboratories)を使用した。他の対照として、各場合ともPBSを一次抗体の代りに用いた。各実験で正の対照として既知の抗O.A.-519のテストを使用した。

OA-5190のエピトープ(抗原決定基)の場合は、若しも(1)免疫反応性が低く、(2)細胞の細胞質染色が観察できるような核内の染色無しに存在し、そして(3)染色が不均一(断片、反応性の水腫や空胞形成など)を示す場合には陽性として判定するであつたならば陽性として定めた。組織は陽性を示した陽性一次特立腫瘍の56例(陽性、57%)に見られた。

平均の前・追跡調査期間は、1.7年(2.01~3.33年の範囲)であった。前・追跡調査は患者の19人(19.9%)に実施したか又は病気が進行した。病気の進行は「治療力のある」治療、例えば前立腺の完全切除または放射線療法などの薬で病気に発生した病変又は転移した病変の出現、又はホルモン療法または外科的な治療法を用いて治療した患者の病気の再発の進行として定義された。病気の進行までの平均時間は2.54年(0.67~5.85年)であった。0A-5.19男性のグループの中で15人の患者の症例(2.7%)があったと比べて0A-5.19男性のグループでは病気の進行は4人の患者の症例(9%)があった(図24-1に示されたKaplan-Meierのプロット)。進行した病気の比率におけるこれらのグループの間の相違は、統計学的に有意でなかった(Wilcoxonと対数ラングの試験( $P < 0.009$ )とFisherの特殊な試験( $P < 0.04$ ))。0A-5.19は低い程度と中間の程度の前立腺癌の間では特に貴重な診断の指標であった。Gleasonの得点評価による組織学的な進行程度は有意な診断の指標ではなかった(ステップは示されていない)。

附錄

上記の乳癌の研究で用いられたのと同じ抗体、染色方法、観察を適用した卵巣癌の Kincinska らの研究が進行中である。しかしながら、今までに完了した 34 の患者の腫瘍の分析に基づく、O-A-5 19 の発現は図 2B に示されるように病気の早い生存率と全体の生存率の減少と関連がある。



「14」 諸動物のミチルエスヲル北

14C 脂肪酸のメチルエステルを分離し、逆相薄層クロマトグラフィーを用いて

10票：OA-519は85%の「ルミチン」だった

### 分光光度計による脂肪酸のシンターゼ検定

**補足：**分光光度計のデータは、与えられた各基1

### FASの強制開の選択的効果

「A-518 国防センター」の電力学的特徴

美國 4: OA-518E-J

分光光度計による酵素の検定で精製されたOA-51号を使用すると、セルレ

OA-519 抑制に対して試験管内の成長が

OA-519抑制の阻害毒性はOA-519シンターゼの阻害

**श्रीगुरुभ्यो नमः**



チリコリン中に取り込まれたことをTLC分析が示したことである。14C-細胞融合マーカーとして、細胞の増殖、またはカスプスチルセルリンは全く検出されなかった。これらのデータは、(a) 増加したFAS活性が増加した全体の脂肪酸合成を示唆すること、(b) 正常細胞ではFASと同時増殖されているアセチルCoAカルボキシルアゼおよびリソソーム膜の活性もまたこれらの細胞中で増加しているかも知れないこと、を意味する。

実験例10: インサインハイブリダイゼーションにより分析されるOAA-519の発現

ZR-75-1ライブラリーからのcDNAは1.6kbのブロー、pFAS1.6を生じたが、該ブローはラット脂肪腺シクターゼのcDNAの3'配列と85%の相同性を示した。ZR-75-1の全RNAのノーザンブロットにおいて、このブローは単一の約9.5kbのメッセージとハイブリダイズした(データは示さず)。Blueprint IIの中のpFAS1.6に由来するジネシグニシブローブを用いた、ホルマリン固定されてパラフィンに埋め込まれたZR-75-1およびDU-4475中のOAA-519に関するインサインハイブリダイゼーションを図9に示す。左のホルネルはアッセンセス、そして右のホルネルはセンセスの対照を示す。pFAS1.6により生じたアッセンセスブローブは、DU-4475細胞よりもZR-75-1細胞に対してより実質的に強いハイブリダイゼーションシグナルを生じた(図9)ことから、マッセンセルと脂肪細胞は一致したことが示された。即ち、OAA-519を発現する細胞は、免疫細胞化またはインサインハイブリダイゼーションのいずれかにより検出可能である。

これらのデータは共に、OAA-519の過剰発現が増加したマッセンセルによるものであり、転写活性化の増加またはマッセンセル安定性が阻害されたことに起因することを示唆している。増加したOAA-519レベルはOAA-519蛋白質の半減期の延長によるものではないらしいが、それはOAA-519蛋白質の過剰発現がOAA-519マッセンセルの過剰発現と伴っていないからである。同様の

EB5. 280: 120-133)、実質的には強い過剰発現において生じるか(5mM/m1におけるウエルスHIVプロテアーゼの阻害、Morel et al. (1990)、FEB5. 261: 373-377)、または内因性脂肪腺シクターゼの阻害の結果でありうる(Bリソソームおよびアトロファジにおける脂肪加工の阻害、Falo et al. (1987)、J. Immunol. 139: 3918-3923)。最近のデータから、セルリンは蛋白質のミストリン化(mristoylation)を特異的に阻害しないことが示唆された(Simon et al. J. Biol. Chem. 267: 3022-3031, 1992)。本発明において用いられた構成において、以下に示すとおり、セルリンは阻害的なFAS活性を発現するヒト脂肪細胞に関する特異的阻害剤である。

実験例10: セルリンの細胞毒性は断セルライオンおよびヒト脂肪細胞におけるアトロファジド合成と平行する

セルリンの細胞毒性は2つの実験フォーマットにおいて研究された。第一は、クロン毒性(固定細胞)分析により、セルリンが細胞毒性であるか、細胞増殖阻害剤であるか、または特異的な作用をもたないかを試験した。ひとたび細胞毒性が確立されると、ハイブリット96ウェルアトロファジドプレート分析を用いて、異なる濃度のセルライオンのさまざまな濃度量に曝して試験した。細胞増殖が内因性脂肪腺の生命成によるならば、セルリンの毒性は脂肪酸の生合成と正比例するべきであり、即ち、高いレベルのFASを伴う細胞はセルリンに曝してより高度に傷むべきである。

クロン毒性分析:

100万の細胞を25cm平方のフライトした。一晚インキュベートした後、細胞は未処理にするかまたは2.5、5、10、0.5m1のセルリンを6時間処理した。次に、トリプシン処理して単一細胞懸液にして、16mmデキシメは、1デキシメあたり1000または500細胞になるように3とトリプシンした。ZR-75-1細胞およびMCF-7細胞に同じでは3日間のインキュベーション後、そしてSKBR3細胞に同じでは7日後、

に、OAA-519の発現が極めて異なるセルライオンのサブセットにおける、pFAS1.6ハイブリダイゼーションシグナルと同等なシグナルを発現するための実験により、過剰発現が遺伝子増強によるものではないことが示された。

実験例9: ヒト脂肪細胞におけるOAA-519の過剰発現

図10は、投入性(infectious)脂質体(duplicate)ホルマリン固定されてパラフィンに埋め込まれた切片上における、アッセンセスにより増殖された抗天然OAA-519ライブラリー細胞を用いた免疫細胞化学染色を示す。OAA-519は、アッセンセス細胞を色として用いる脂質体と脂質体免疫化学を用いて検出された。FASの発現の特異性を図10に示す。投入性脂肪細胞のサイトプラズムはOAA-519抗体に強く反応したが、組織学的に正常な細胞の上皮および間質細胞の細胞核は反応しなかった。過剰発現のサイトプラズムにおける強い染色の発色はOAA-519の発現を示すが、正常な脂肪細胞および小葉(実用)および脂肪細胞は陰性であった。脂と正常細胞の間の脂肪腺シクターゼの発現の違いは、インサインにおけるFASの増進性阻害の基盤を形成する。

FASの特異的阻害剤

以下の実験例は、脂肪細胞へのセルリンの作用を示す。セルリン、即ち脂肪腺シクターゼの特異的かつ非競争的阻害剤は、脂肪細胞において脂肪腺シクターゼの代表的阻害剤として研究された。セルリンは脂肪腺シクターゼの過剰発現の活性部位中のチオール基に共有結合して、脂肪腺の重要な酵素的機能を不活性化する(Unabashed et al. J. Biochem. 105, 751-755, 1989)。脂肪腺酸化反応、即ちアッセンセスまたは初期の脂肪腺酸化によりセルリンCoAの過剰を触発してCoAを生じる反応は、アッセンセスの最も特異的な反応であり、他の酵素により切断されない。セルリンは他の活性を持することが記されてきたが、それらは、ヒトの脂肪細胞とは無関係なマウス脂肪細胞において生じるか(例えば、カビのコレステロール合成阻害、Omura (1976)、Bacteriol. Rev. 40: 681-697; またはウエルス中のRNA合成の低下、Perez et al. (1991)、F

コロニーを数え、未処理対照に対するパーセンテージとして表した。

図11Aに示すとおり、クロン毒性分析において10.5mM/m1のセルリンを処理したMCF-7細胞は増加した細胞増殖性を示した。10.5mM/m1において増殖時間を24時間に増加させると、310%以上の細胞死をもたらした。即ち、セルリンは内因性脂肪腺合成を誘発したセルライオンに対して細胞毒性であった。

増殖阻害の測定: セルライオンをウエルあたり5,000細胞にして96ウェルアトロファジプレートにプレートした。18時間の増殖後、セルリン(10%のDMSCOに希釈)を増加に加えて10.5mM/m1とした。各時間点において空のウエル対照と共に4と処理した。セルリンへの24時間の増殖後、細胞はクリスタルバイオレットで染色し、1%SDSに溶解し、そして分子診断自動プレートリーダー上で570nmにおいて読取を讀んだ。エラーのパーセントの標準偏差を示す。

アトロファジドプレート細胞毒性分析から、図11Bは、10.5mM/m1セルリンへの24時間の増殖後、すべてのセルライオンにおいて相対的な増殖阻害が予め測定された脂肪腺生合成の速度に直接関連していたことを示した。MCF-7アトロファジドプレート細胞はセルライオン(MCF-7a)は唯一の阻害剤例外であった。FAS活性に依する増殖阻害のグラフは、同様の結果を示した(実験例6および7を参照されたい)。即ち、セルライオンに対する増殖阻害は内因性脂肪腺生合成またはFAS活性のレベルにより大規模に予測できた。重要なことは、このことが過剰発現にも正常な脂肪腺細胞にもあてはまることである。したがって、セルリン増殖阻害と脂肪腺生合成の関係は正常脂肪細胞における例外的特徴ではなかった。

実験例11: セルリン(Cerulein)は14C-酢酸のアトロファジドプレートへの取り込みを用意効率的に阻害するが、コレステロール合成はセルリンによって一貫して阻害されるわけではない。

アトロファジドプレートおよびコレステロールへの内因性脂肪腺の取り込み

各脂肪用量に対する非毒性および毒性脂肪分析のために、各細胞株毎に200,

0.00の細胞を3層に24ウェルプレートにプレートした。1時間培養させた後、それぞれ0、2、5、5.0または10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるようにセルレニン（10%DMF SO中に希釈したもの）を加えて、細胞を6時間インキュベートした。セルレニンを加えたインキュベーションの最後の2時間、各ウェル毎に1  $\mu\text{Ci}$  の<sup>14</sup>C-酢酸を加えた。続いて<sup>14</sup>C-ラベルされた質を抽出し、クロマトグラフにかけ、上流したように抽出した。抽出液は平均の放射能を示す。図12Aは、<sup>14</sup>C-酢酸のラジアルゲリゲルでの画り込みが、表3に述べられた5つの細胞系においてセルレニンによって阻害される、恒常的にかつ有意に阻害されたことを示す。これとは逆に、図12Bは、コレスチロール合成は、わずかに阻害されるMCF-7細胞から阻害されるSKBR3細胞まで、影響の度合いは不定的にかつ微弱であることを示す。これらのデータは、セルレニンはコレスチロール合成の調節に直接に影響を与えているのではないことを示唆する。さらに、これらの細胞系におけるコレスチロール合成の速度レベルと、セルレニンの増殖阻害との間には相関性がなかった（データは示さない）。従って、セルレニンは癌細胞系および正常細胞系においてコレスチロール合成に有意なまたは恒常的な影響を及ぼさなくアジュグワリド合成を阻害した。

### 実験例12. セルレニン増殖は細胞増殖とは相関しない。

有糸分裂指数 (Kuhajdaら、N. Engl. J. Med. 321: 636-641, 1989)、増殖性細胞指数 (PCNA) の測定 (データは示さない) またはフローサイトメトリーによる細胞周期とFAS増殖との相関 (Shuら、J. Cell. Physiol. 148: 199-204, 1993) によって測定されるように、臨床的乳癌およびいくつかの細胞系におけるO.A.-519増殖は増殖には依存しないので、セルレニンの抗増殖活性は癌細胞の増殖とは相関しないと考えられる。ミクロアッセイプレートを用いて、6つの細胞系の増殖時間を測定し、セルレニン増殖阻害 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と比較した。癌細胞の増殖時間とセルレニン増殖阻害またはFAS増殖とは相関しなかった (図13)。

を成長 (対照の成長の%として) に対してプロットする。

TOFA (アセチルコカルボキシルラーゼの阻害剤: Illiverson, D. L. and McOne, S. A. Lipids 19: 351-356, 1984) に48時間暴露したところ、SKBR-3、ZR-75-1、SW48およびHS27細胞系は、それぞれ44.7、59.8、0.8および4.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のID50で成長が阻害された。図15に示されるように、TOFA (5-チオチラチルオキシル-2-プロパノール) は、より低いレベルのFAS活性を阻害する細胞系 (HS27およびSKBR-3) よりも、高いFASの細胞系 (ZR-75-1およびSW48) の成長阻害に対してより効力が低かった。

実験例15: 様々な脂肪合成阻害剤によるSKBR-3細胞成長の阻害。これらの実験においては、細胞をラベルした500細胞で96ウェルマイクロアッセイプレートに播種し、10%無活性化ラジアルゲリゲルを含むRPMI-1640中で72時間培養した。次に、表4に示される化合物を加え、細胞をさらに48時間インキュベートした。次に、トリスタルバイオレット法を用いて成長阻害を測定した。

トSKBR-3乳癌細胞系 (表3にFAS活性を示す株として示される) の成長を阻害するために必要なセルレニンの濃度は、実験例X-4の対立調節細胞系の成長阻害に必要な濃度と同様であった。表4に示されるように、3.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に48時間暴露した場合、成長は50%阻害された。また、表4に示されるように、脂肪阻害剤は、これらの培養細胞により誘導される脂肪合成の他の化合物と同様に、0.3から5.1、4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲の50%阻害阻害 (ID50) でSKBR-3乳癌細胞系の成長をよく阻害した。

これらのデータを総合すると、セルレニンならびに脂肪合成阻害剤の他の阻害剤が、乳癌、結腸および肝臓の癌細胞系の成長をよく阻害することが示される。さらに、成長阻害の効力は、これらの培養細胞により誘導される脂肪合成の相対レベルに比例した。

### 実験例13. セルレニンの対立調節細胞系に対する抗増殖活性。

比較的低いFAS活性を示す2細胞系のトランスローラン-非依存性対立調節細胞系 (表3) についてもセルレニンの抗増殖活性の測定を行った。TSUP-R1およびDUP-R1細胞系を10%ラジアルゲリゲルを含むRPMI-1640中に2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  あるいは、それぞれ3  $\times 10^{-6}$  および1  $\times 10^{-6}$  細胞/2、9.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の対立調節細胞系下においてプレートした。24時間後、対立調節細胞系を測定した。さらに、2層の培養液に増殖を促すため (コトローリン)、または、セルレニンを2.5-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  加えた。48時間後、細胞をトランスローラン、生きた細胞 (トランスローラン以外のもの) をカウントした。増殖した細胞の数を算出した。これらの細胞系も、セルレニン (3-4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に48時間さらすと、対立調節細胞系と比較して増殖した細胞数が50%に阻害された。図14は、2つの対立した実験のうち1つの代表的なデータを示す。

### 実験例14: アセチルコカルボキシルラーゼの阻害剤による癌細胞の成長阻害。

TOFA (アセチルコカルボキシルラーゼの阻害剤) もまた、癌のレベルのFAS増殖活性 (表3に示される) および脂肪阻害剤 (図8に示される) を有する癌細胞のレベルに対する抗増殖活性を示した。この実験は、トリスタルバイオレチン成長阻害アッセイを用いて実施された。癌の細胞のFAS活性を有する細胞系、10%無活性化ラジアルゲリゲルを含むRPMI-1640中で、ラベルした500細胞で96ウェルプレートに播種した。図15に示されるように、TOFA (5-チオチラチルオキシル-2-プロパノール) を加え、増殖時間を計り、48時間インキュベートした。次にプレートを取り出し、記載したようにトリスタルバイオレチンにより染色した。それぞれの濃度の試験 (n=4)、対照 (n=8) およびバタグラウンツド (n=8) について濃度の差を平均した。バタグラウンツドの読みを引いた。図15に、TOFAの濃度

表4: 内因性脂肪合成阻害剤による癌細胞の成長阻害

阻害剤	化合物	
	化合物	ID <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
2-エチルブチレート	5-カルボキシチラチルコA	61.4
	プロモビルベート	52.0
3-イソブチレート	3-イソブチレート	3.1
	N-エチルブチレート	0.9
アセチルコA	セトキシル	9.5
	5- (チオチラチルオキシル) -2-プロパノール	4.6
脂肪合成阻害剤	セルレニン	3.6
	3-エトキシチラチル	0.3

高レベルのFAS活性を示すことが示されているSKBR-3乳癌細胞系を、96ウェルマイクロアッセイプレートに500細胞/ウェルで播種し、10%無活性化ラジアルゲリゲルを含むRPMI-1640中、9.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の対立調節細胞系で播種した。72時間後、化合物を加え、細胞をさらに48時間インキュベートした。プレートをトリスタルバイオレチンで染色し、吸収を記載されるように測定した。ID<sub>50</sub>は、4重測定および分析により、対照の吸収の50%減少をもたらす化合物の用量を示す。

### 実験例16: トランスローランとセルレニンとの相関の測定

ZR-75-1細胞を25,000細胞/ウェルで96ウェルマイクロアッセイプレートに播種し、5%CO<sub>2</sub>中で37℃において一夜 (18時間) インキュベートした。トランスローランを加えて、0.2、5、5.0または10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のセルレニンの存在下で次の濃度 (アジュグワリド) にした: 5.0、2.5、1.2、5、6、2、3、1、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1および0.0。それぞれの濃度は4重で実施された。細胞を24時間インキュベートし、PBS



中で洗浄し、1%SDS中で可溶化し、2%エタノール中の0.2%クリスタルバイオレットで染色し、セルキエラー・グロース・チャウス(Morley et al Bar Diagnostics)プレートリーダーで490nmの読みを測定した。

図16は、トリプシン-CがOA-519<sub>max</sub>を溶解する臨界細胞数(2R-75-1)の細胞の成長を阻害することを示す。セルレニンをその1D<sub>50</sub>に近いレベルで加えた場合、トリプシン-Cの1D<sub>50</sub>は、約15μMから1μM未満に低下し、このことは、これらの2つの阻害剤の組み合わせが相乗効果を示すことを示す。

実験例17: 外因性オレエート放出の測定

セルレニンによる増殖阻害からの2R-75-1細胞

図17は、2R-75-1細胞増殖におけるセルレニン阻害が外因性のオレエートの濃度で可逆性であることを示す。2R-75-1細胞(1つセルあたり5,000個)を、説明したラジアルフローアッセイに4:1のセル比で融合したオレエート、0.0, 0.5, 1.0又は1.5mMで満足した増殖の96ウェルマイクロタイタープレート中にブレンドした。18時間インキュベートした後、セルレニンを10μM/m1で添加した。24時間(図17、上の線)又は48時間(下の線)後、実験例10と同様にして細胞を染色し分析した。図17の中間の線は、セルレニンなしでオレエート濃度を含有する増殖を24時間目に開始し、全部で48時間インキュベートした後分析した細胞を著す。調製パームは平均の増殖速度を示す。

図17の一番上の曲線では、細胞が0.0, 0.5, 1.0又は1.5mMのオレエートの存在下で24時間10μM/m1のセルレニンに暴露された場合、オレエートの1.5mM濃度はセルレニンによる増殖阻害について事実上完全に逆転させた。48時間細胞をインキュベートすると、一番低い曲線により示されている通り阻害が起きた。この曲線はオレエートによる逆転はなかった。48時間で見られた抗増殖活性が増加中のオレエートの結合によるとすると、24時間目に同じオレエート濃度を含有する新鮮な増殖(追加のセルレニンは含有

しない)を細胞に再供給すると細胞を救うであろう。中間の曲線は24時間目に細胞に再供給したときのこの効果を示すが、事実1.5mMオレエートで48時間後細胞を救った。オレエートが存在しないとき、再供給と再供給しない細胞は、同様のセルレニン増殖阻害を示した。

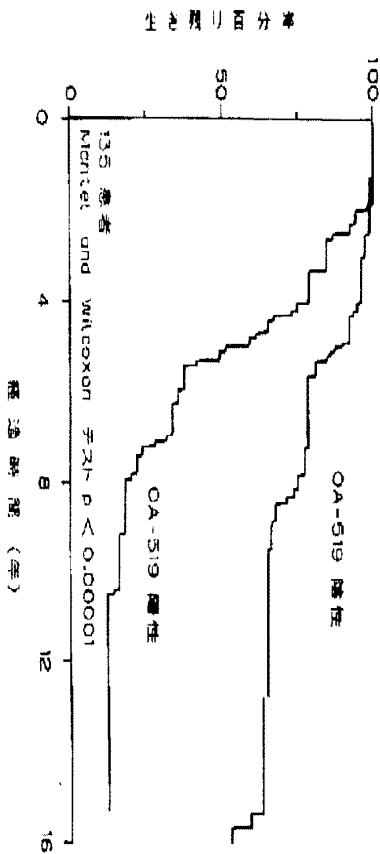
実験は、セルレニンの抗増殖活性からの放出が通知の細胞死によるものであり、増殖中に存在する増殖因子のようなグルコースや他の物質によるものでなかったことを示す。実験のあることに、SW-480や正常ヒトマイプロブラストのような低FAS活性をもつ細胞系は、より低い(0.5mM)、生理学的濃度のオレエートを要求し、セルレニン増殖阻害からの放出を達成した(実験例5参照)。2R-75-1細胞(1.5mM)を救うのに必要なオレエートの量は細胞増殖率の量であり、この量は最初の細胞数を食む量により達成できると思われる。これらのデータを含めると、セルレニンは細胞の死をもたらす脂肪酸欠乏の状態を作り出すことにより作用することを示唆しており、これは内因性脂肪酸合症の量に比例する。

本発明を特定の実験細胞に結び付けて説明したが、前述の詳細な説明及び実験例は例証のためであり本発明の範囲を限定するものでないことが了解されよう。他の増殖、刺激及び修正は本発明に関連する当業者に明らかであり、これらの増殖及び修正は本発明の範囲内であり、添付の請求の範囲によってのみ限定される。

増殖(内容は変更なし)

FIG. 1

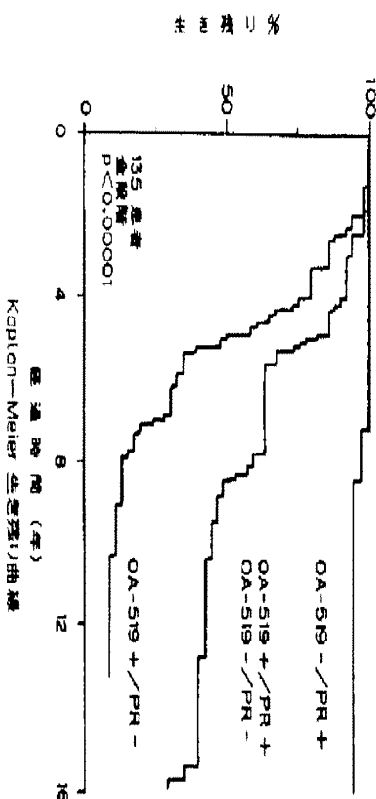
乳癌のOA-519(FAS)増殖及び生存曲線



増殖(内容は変更なし)

FIG. 1A

OA-519及びプロテアソーム阻害剤の免疫組織学的検出は乳癌患者に対して予後的判定に役立つ



の7(19位に変更なし)

FIG. 2A

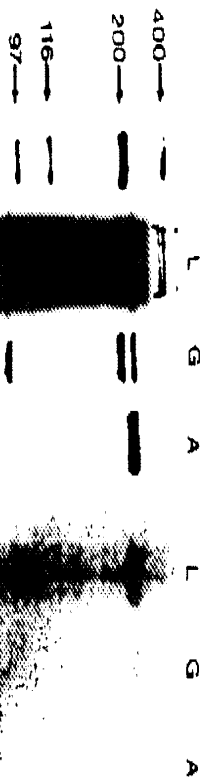
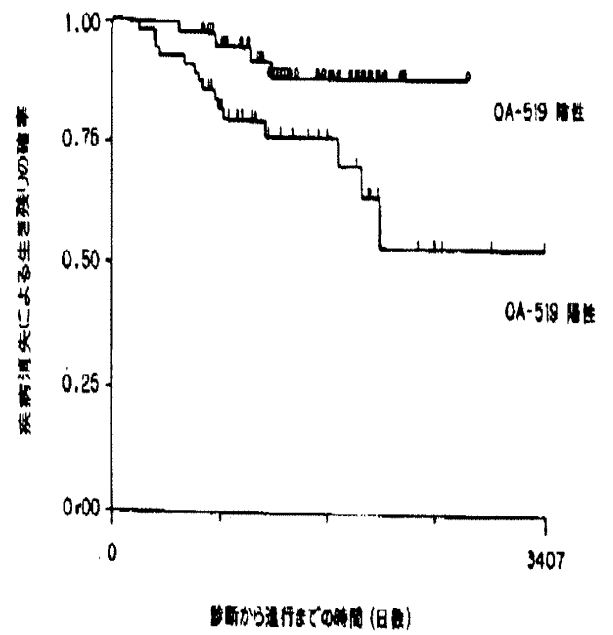


FIG. 2C

の7(19位に変更なし)

FIG. 3A

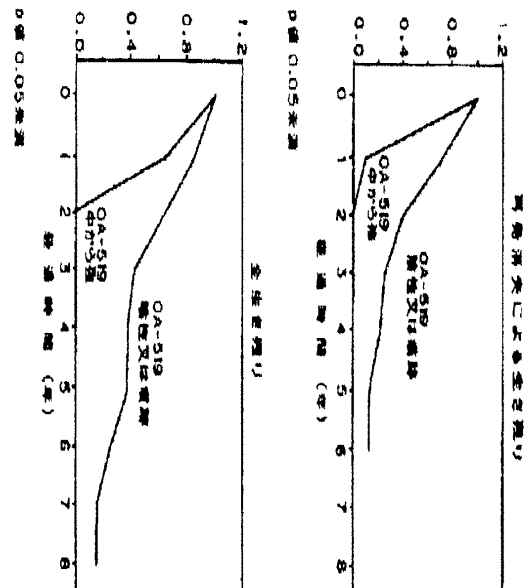
OA-519と免疫学的に交差反応性のペプチドの34アミノ酸配列

Leu Tyr Ser Gly Asp Val Thr Asp Ile Ser Asp Arg Phe Pro Lys Pro Pro Glu Ile Ala Asn Gly Tyr  
Val Glu Lys Leu Phe Arg Tyr Gln Cys.

の7(19位に変更なし)

FIG. 2B

腫瘍組織におけるOA-519発現及び予後



特許(内容に変更なし)

FIG. 38

OA-519ペプチド配列分析

配列 1 : 134kD OA-519ペプチド配列相関の分析

OA-519ペプチド配列 : LQQHDVAQEQWXP  
 |||||:|:  
 ラット脂肪酸シンターゼ (EC 2.3.1.85) : TKLQQHDVAQGGWDPSGPAPTNLGALD  
 1290 1300

重複した13個のアミノ酸のうち84.6%同一

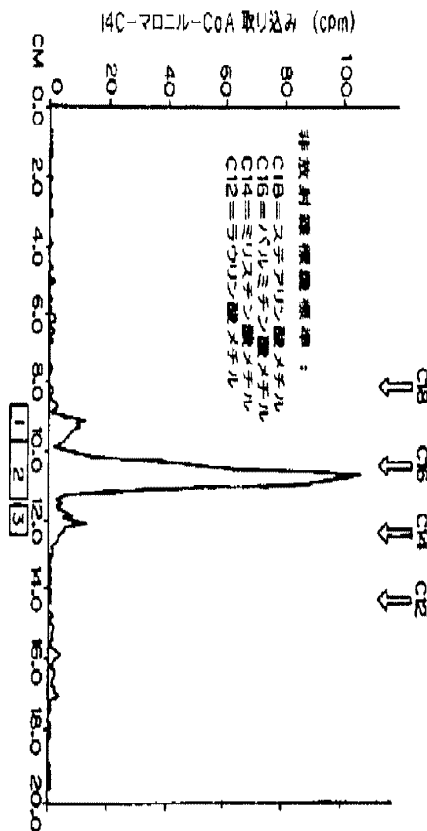
配列 2 : 1991年7月26日に出願した一部特許出願(米国特許出願番号 07/735522号)  
 の実施例 12からのOA-519ペプチド配列の分析

OA-519ペプチド配列 : HAVVLE  
 |||||  
 ラット脂肪酸シンターゼ (EC 2.3.1.85) : HAVVLE

重複した6個のアミノ酸のうち100%同一

特許(内容に変更なし)  
 FIG. 4

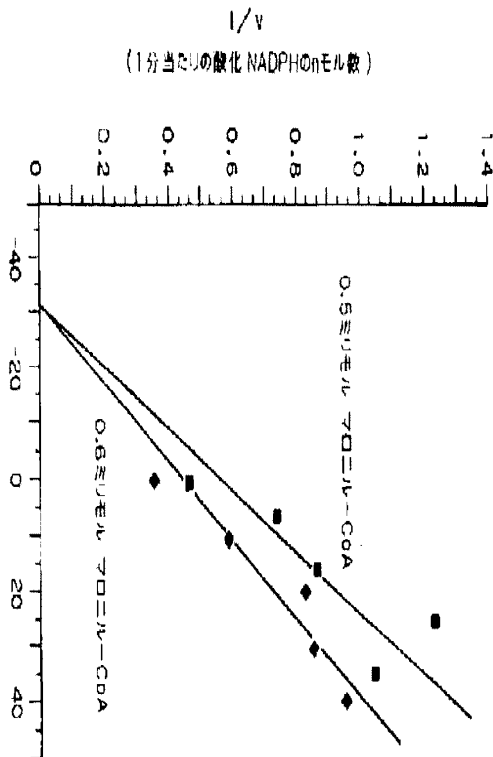
OA-519はアセチル-及びマロニル-CoAから脂肪酸を合成



特許(内容に変更なし)

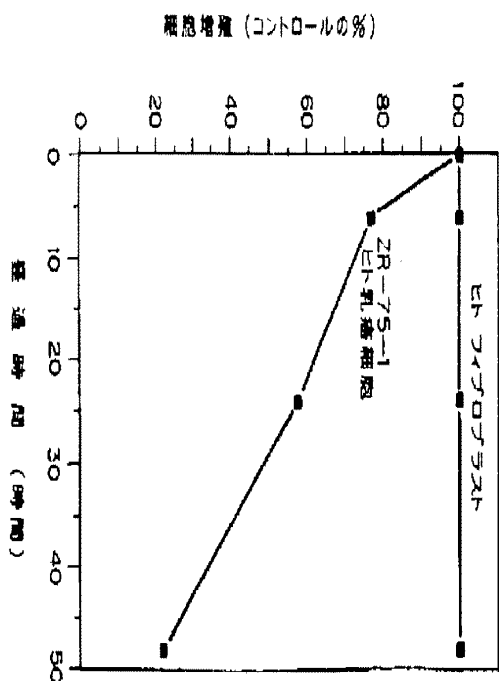
FIG. 5

OA-519脂肪酸シンターゼ活性のセルシニ阻害の Dixon プロット



特許(内容に変更なし)

FIG. 6



ZR-75-1

DU-4475



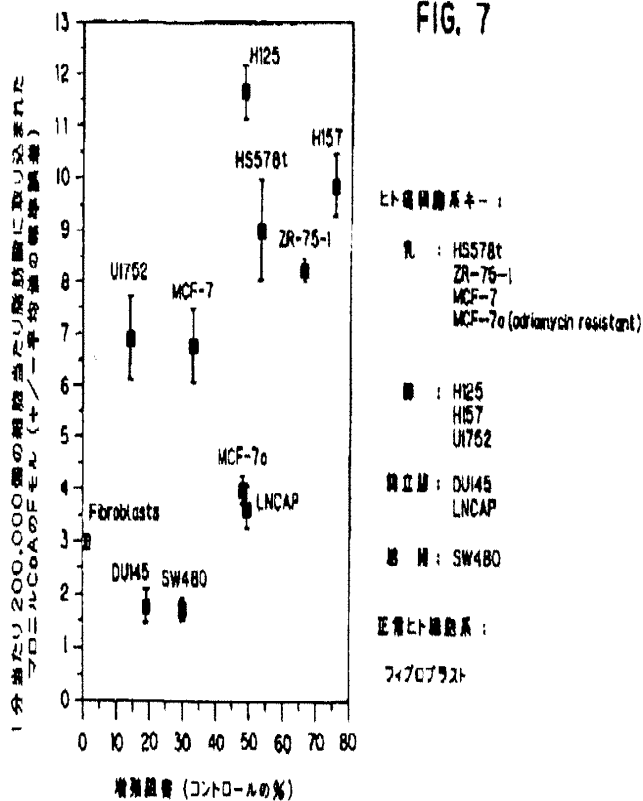
FIG. 9  
わび(内容に変更なし)

FIG. 10



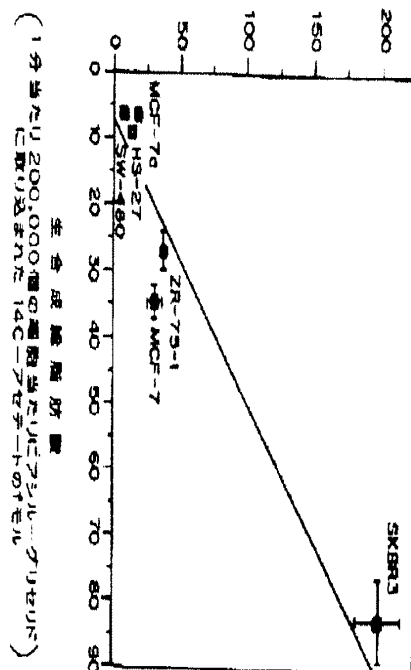
わび(内容に変更なし)

FIG. 7



FAS活性

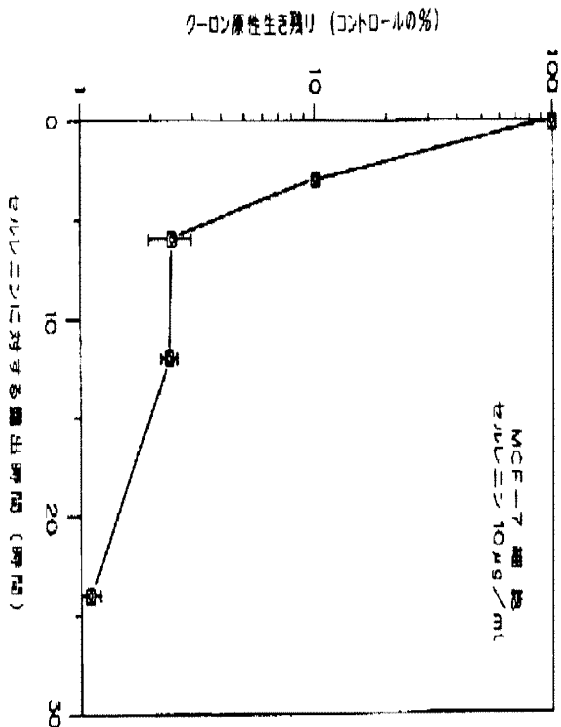
(1分当たり且200,000個の細胞当たり1脂防酸)  
に取り込まれた<sup>14</sup>C-マウリンC-CoAのpmol



脂肪酸シンターゼ(FAS)活性及び合成脂肪酸の相関

FIG. 8  
わび(内容に変更なし)

**FIG. 11A**

ヒト乳房MCF-7細胞のフローロン原性  
生え残りにおけるセルシニンの影響

静謐(内容に変更なし)

FIG. 11B

FAS活性とセルレニンによる細胞成長阻害の程度との関係

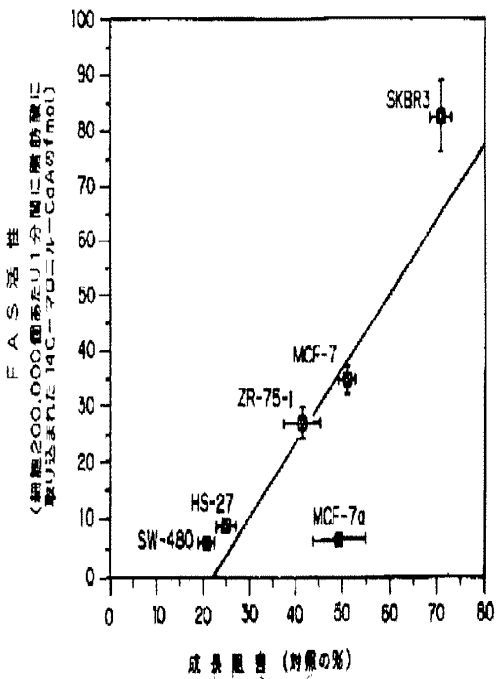


FIG. 12A

細胞200,000個あたり1分間にアシルグリセリドに  
取り込まれた $^{14}\text{C}$ -アセテートのf mol

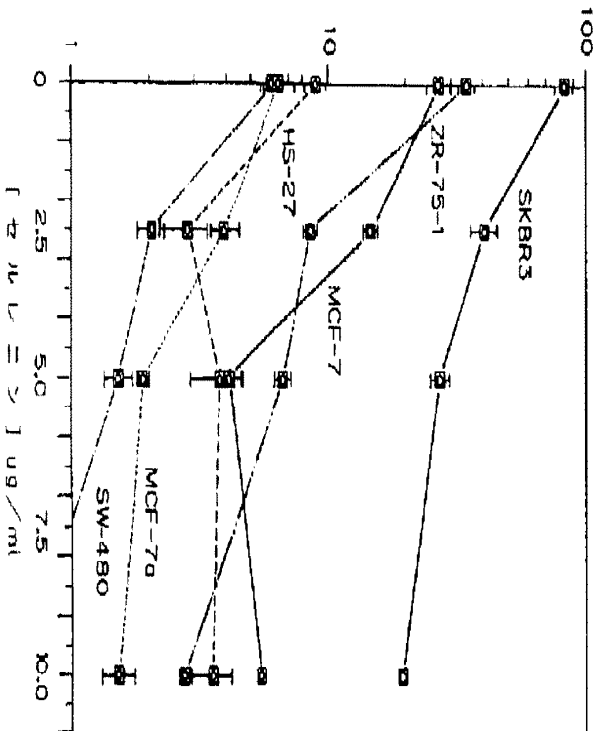
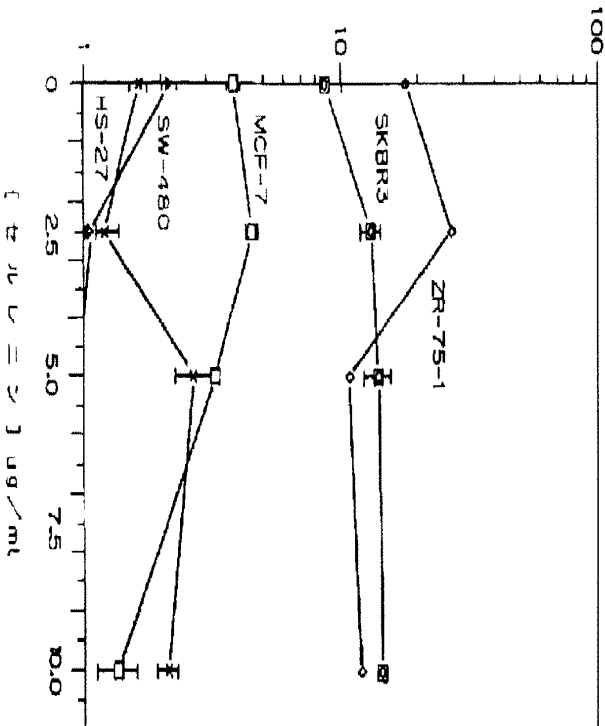


FIG. 12B

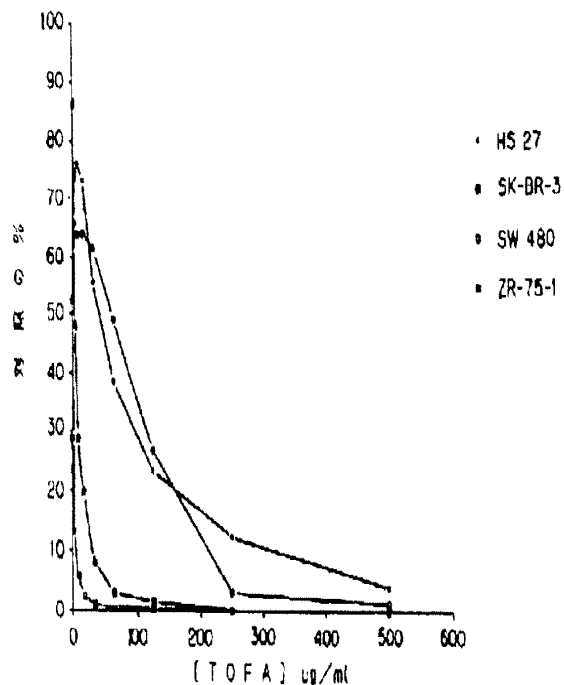
細胞200,000個あたり1分間にコレステロールに  
取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -アセテートのfmol



※(内容に変更なし)

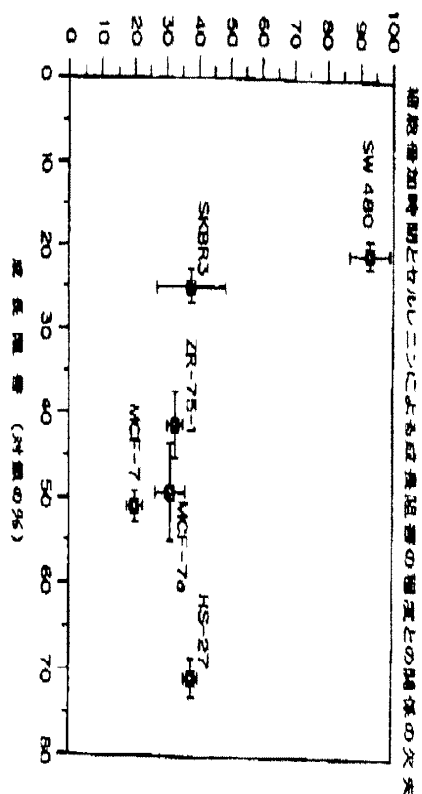
FIG. 15

TOFAによる成長阻害の効力



※(内容に変更なし)

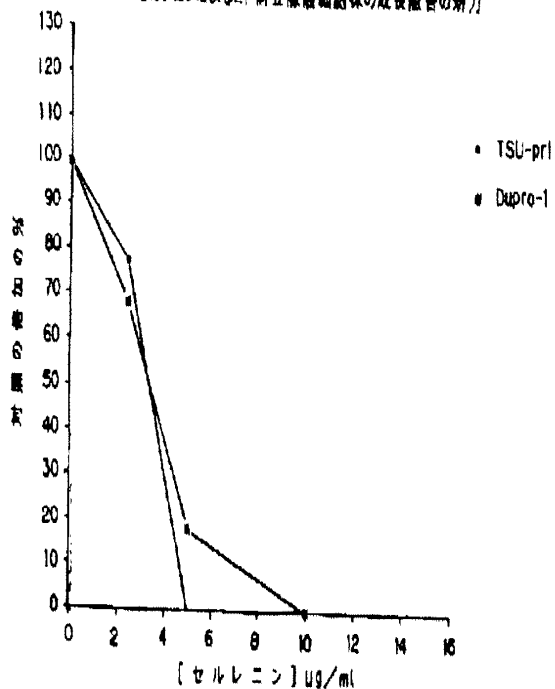
FIG. 13



※(内容に変更なし)

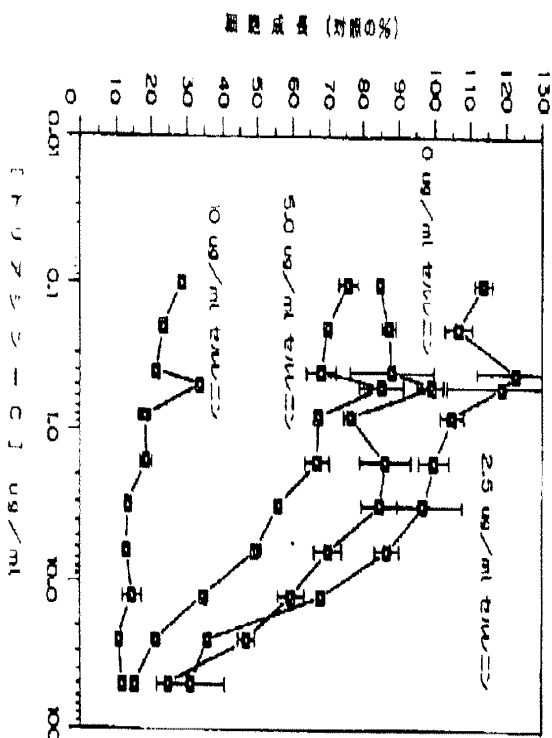
FIG. 14

セレンによるヒト樹立腺癌細胞株の成長阻害の効力



※(内容に変更なし)

FIG. 16



特許庁長官 高 島 章 殿

1. 事件の系示  
PCT/US93/07023  
平成6年特許願第504755号

2. 発明の名称  
がんの治療に脂肪酸合成阻害剤を用いる方法

3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人

住所 名 称 サ・ジョーンズ・ホフキンス・ユニバーシティ

4. 代理人 住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206号

氏 名 (2770) 弁護士 湯 島 恭 三

5. 補正の対象  
(1) 出願人の代表者名を記載した国内書面  
(2) 委任状及び翻訳文  
(3) プレイアト書により存続した明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文  
(4) 図面翻訳文

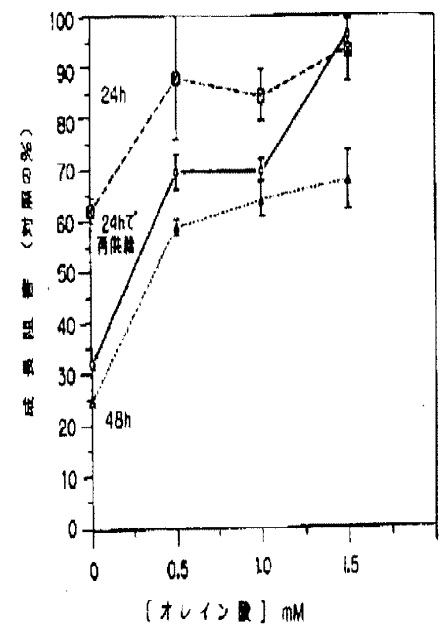
8. 補正の内容  
別紙の通り (附、上記(1)(4)の書面の内容には変更なし)

特 許 庁  
- 7, 4, - 6  
(500000000)

特許(内容に変更なし)

FIG. 17

外因性オレイン酸によるセルレニン成長阻害からの細胞ZR-75-1細胞の救出



国 際 実 業 報 告

International Application No.  
PCT/US 93/07023

IPC Class. Int. Cl. 6  
A61K31/20 A61K31/23 A61K31/24

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

国 際 実 業 報 告

International Application No.  
PCT/US 93/07023

IPC Class. Int. Cl. 6  
A61K31/20 A61K31/23 A61K31/24

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

本特許出願は、1993年12月17日に出願された、米国特許第5,481,416号に開示された発明に係るものである。

<p>1-62</p>	<p>1-62</p>
<p>1-62</p>	<p>1-62</p>

[illegible]

Document Number	Publication Date	Accession Number	Publication Date
DD-A-215818			
EP-A-0246734	25-1-43		
US-A-318246	00-06-42		
		INDEX	
		44-4-1	5486312
		44-4-1	7816387
		44-4-1	12847827
		44-4-1	5128452
		44-4-1	5128452
		44-4-1	5246726
		INDEX	
		44-4-1	5486312
		44-4-1	7816387
		44-4-1	12847827
		44-4-1	5128452
		44-4-1	5128452
		44-4-1	5246726



(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, VN

【公報種別】 特許法第 17 条第 1 項及び特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成12年12月12日（2000.12.12）

【公表番号】特表平7-509470

【公表日】平成7年10月19日（1995. 10. 19）

【年通号数】

【出願番号】特願平6-504755

【國際特許分類第7版】

A67K 45/00 AED

38/00 ADU

【F I】

A67K 45/00 AED

37/22 ADU

五  
四  
三  
二  
一

平成12年7月24日

2014年12月

・ 事件の概要

平成6年 統計調査 第504766号

## 2. 補正をする事

ザ・グロ・ジャズ・ホフキス・ユニバーシティ

「**天**」

住 戶 東原鄉干松村區太平町三丁目二番上

新大正町 2004 ユノカノハ 庭園美術館 五

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

一 五十二 五十三 五十四 五十五 五十六 五十七 五十八 五十九 六十 六十一 六十二 六十三 六十四 六十五 六十六 六十七 六十八 六十九 七十 七十一 七十二 七十三 七十四 七十五 七十六 七十七 七十八 七十九 八十 八十一 八十二 八十三 八十四 八十五 八十六 八十七 八十八 八十九 九十 九十一 九十二 九十三 九十四 九十五 九十六 九十七 九十八 九十九 一百

## 結束の範圍

新正の御挨拶

1999-2000

## THEORY

2018年12月

(5) 経

同様の疑問を下記の通り修正する。

1. 消費者の生活必需品の供給を確保することの目的で、米、油、食糧用物資等の需要を抑制し、販路の確保、組合員の増進等を図る。また、組合員を育成し、組合員による販路の確保、販路の増進を図ることを目的とする。

2. 高圧電解槽の設計、船舶用ポンプ—セリ性生体システムの開発を環境省に請求
3. 工業界の環境化技術

す、漁獲するのにも効き目の悪い酸や、タンニンを多く含むものを使う、船が腐りやすくて船体を下すなど、バカを食ふ不愉快な経験をたれど、船乗者の負担を減らすための工夫が随分

4. 前記設備の不足を補填し、設備の改善を図るため、事業年度中の固定資産の取得に要する資金を前年度に比し、増加した。

と、研究費の削減に際しては、研究員及びその立派な研究員から、研究費を削減するに当たっては、研究員一人一人の収入を削減するのではなく、研究員一人一人の研究費を削減する。

the maps also depict many other jobs, from fire-fighters to gas station attendants, but the jobs that are the most important to the country are the ones that are the most difficult to find. The jobs that are the most difficult to find are the ones that are the most important to the country.

7. どのようにして、主として、この問題を解決するべきか、という点について、各委員は、次のように述べた。

る。新島は以前、マンモス骨の埋蔵や龍の足跡の発見を報告するなどの功績があるが、この功績は、この功績の功績である。

[illegible]

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 84

[illegible]

のいずれかに配糖の医薬組成物)。

1.2. 糖基結合体の耐糖利尿、脂肪燃焼剤の使用については、C.4.4.4.条の「イ」を示す。請求項1.1に配糖の医薬組成物。

1.3. 脂肪燃焼剤糖基結合体薬剤が、脂肪燃焼剤とスクーザを含有する組成による糖基結合の阻害について、C.4.4.4.条の「イ」を示す。請求項1.1に配糖の医薬組成物。

1.4. 脂肪燃焼剤糖基結合剤（FAS）である請求項1.1に配糖の医薬組成物。

1.5. 阻糖剤がセルロースである請求項1.4に配糖の医薬組成物。

1.6. 糖質生合成の阻糖剤である請求項1.5のいずれかに配糖の医薬組成物。

1.7. 糖質生合成の阻糖剤がトリアジンである請求項1.6に配糖の医薬組成物。

1.8. 糖質の糖基結合の糖基化を促進するのに向付たなるトリアジン（Triazin）分析方法であって、脂肪燃焼剤からの阻糖剤とスクーザの糖基化促進を示すトリアジンの糖基化を促進することを包含、脂肪燃焼剤とスクーザの糖基化促進を示すトリアジンの糖基化による糖質生合成阻害の改善である。脂肪燃焼剤とスクーザの糖基化促進。

1.9. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.0. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.1. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.2. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.3. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.4. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.5. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.6. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.7. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.8. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.9. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.10. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.11. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.12. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.13. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.14. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.15. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.16. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.17. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.18. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.19. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.20. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.21. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.22. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.23. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.24. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.25. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

2.26. 脂肪燃焼剤糖基結合体の糖基化促進方法である。請求項1.8に配糖の方法。

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



CITATION (1)

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| (51) International Patent Classification 5 :<br>A61K 31/00, 31/335, 31/20, 31/23, 31/34  |  | A1  | (11) International Publication Number:<br>WO 94/02108 |
| (21) International Application Number:<br>PCT/US93/07023   |  | (43) International Publication Date:<br>3 February 1994 (03.02.94)  |   |
| (22) International Filing Date:<br>26 July 1993 (26.07.93)   |  |   |   |
| (30) Priority data:<br>917,716 24 July 1992 (24.07.92) US  |  |   |   |
| (71) Applicant: THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (US/<br>US); 720 Rutland Avenue, Baltimore, MD 21205 (US).  |  |   |   |
| (72) Inventors: KUHAJDA, Francis, P.; 5409 St. Albans Way,<br>Baltimore, MD 21212 (US); PASTERNAK, Gary, R.;<br>311 Edgevale Road, Baltimore, MD 21210 (US). |  |   |   |
| (74) Agents: HOSCHETT, Dale, H. et al.; Banner, Birch,<br>McKie & Beckett, 1001 G Street, N.W., 11th Floor,<br>Washington, DC 20001 (US).                    |  |   |   |
|  |  | <p><b>Published</b><br/><i>With international search report.<br/>Before the expiration of the time limit for amending the<br/>claims and to be republished in the event of the receipt of<br/>amendments.</i></p> |   |

(54) Title: USE OF INHIBITORS OF FATTY ACID SYNTHESIS FOR TREATING CANCER

(57) Abstract

Fatty acid synthase (FAS) is overexpressed in carcinomas with poor prognosis, but little FAS expression is identified in normal tissues. Inhibition of fatty acid synthesis is selectively toxic to carcinoma cells, while normal cells with low FAS activity are resistant. This invention provides a method of treating cancer patients where fatty acid synthesis by cells of the patient's tumor is inhibited with resultant interruption of the disease process.